

**METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING****Publication number:** JP6505625 (T)**Publication date:** 1994-06-30**Inventor(s):** ERLICH HENRY A [US]; BEGOVICH ANN B [US]; BUGAWAN TEODORICA [US]; GRIFFITH ROBERT L [US]; SCHARF STEPHEN J [US]; APPLE RAYMOND J [US]**Applicant(s):** HOFFMANN LA ROCHE [CH]**Classification:**- international: **C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68**

- European: C12Q1/68M4

**Application number:** JP19920502862T 19911206**Priority number(s):** US19900623098 19901206; WO1991US09294 19911206**Also published as:**

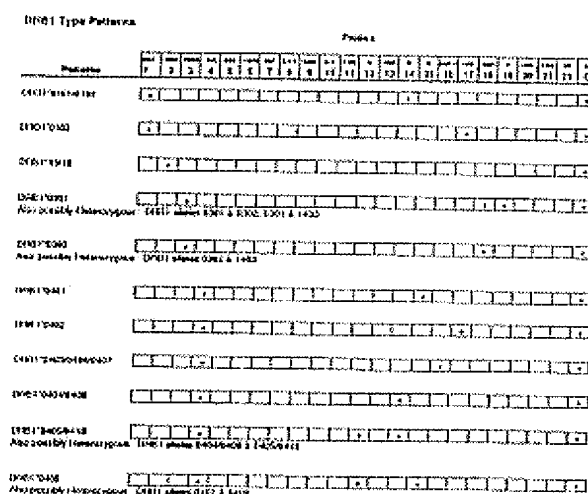
JP3643375 (B2)  
 WO9210589 (A1)  
 ES2115667 (T3)  
 EP0514534 (A1)  
 EP0514534 (B1)  
 DK514534 (T3)  
 DE69129192 (T2)  
 CA2075037 (A1)  
 CA2075037 (C)  
 AU9136191 (A)

&lt;&lt; less

Abstract not available for JP 6505625 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9210589 (A1)**

Primers for amplification of specific nucleic acid sequences of the second exon of HLA DRbeta genes and probes for identifying polymorphic sequences contained in the amplified DNA can be used in processes for typing homozygous or heterozygous samples from a variety of sources and for detecting allelic variants not distinguishable by serological methods. This HLA DRbeta DNA typing system can be used in a dotblot format that is simple and rapid to perform, produces detectable signals in minutes, and can be used for tissue typing, determining individual identity, and identifying disease susceptible individuals.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

# Family list

Approximately 341 application(s) for: JP6505625 (T)

- 1 Probe groups for the detection of nucleotide variations and genetic polymorphisms.**  
**Inventor:** ERLICH HENRY ANTHONY ; SAIKI      **Applicant:** CETUS CORP [US]  
RANDALL KEICHI (+2)  
**EC:** C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)      **IPC:** C07K14/74; C12Q1/68; C07K14/435; (+3)  
**Publication info:** AT73502 (T) — 1992-03-15
- 2 Means for amplifying nucleic acid sequences.**  
**Inventor:** MULLIS KARY BANKS      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
**EC:** B01L7/00D; C12Q1/68D4      **IPC:** B01L7/00; C12Q1/68; C40B40/06; (+9)  
**Publication info:** AT83505 (T) — 1993-01-15
- 3 Kit for use in amplifying and detecting nucleic acid sequences.**  
**Inventor:** MULLIS KARY BANKS ; ARNHEIM      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
NORMAN (+4)  
**EC:** B01L7/00D; C07K14/805; (+3)      **IPC:** B01L7/00; C07K14/805; C12N15/10; (+13)  
**Publication info:** AT84822 (T) — 1993-02-15
- 4 CHARACTERIZATION AND DETECTION OF SEQUENCES ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DISEASES**  
**Inventor:** ERLICH HENRY A [US] ; HORN      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
GLENN T [US]  
**EC:** C12Q1/68M6; C07K14/705B28; (+1)      **IPC:** G01N33/53; A61K38/00; A61K39/395; (+19)  
**Publication info:** AT106454 (T) — 1994-06-15
- 5 Process for detecting specific nucleotide variations and genetic polymorphisms present in nucleic acids and kits therefor.**  
**Inventor:** ERLICH HENRY ANTHONY [US] ;      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
SAIKI RANDALL KEICHI [US] (+2)  
**EC:** C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3)      **IPC:** C12N15/09; C07K14/74; C12Q1/68; (+6)  
**Publication info:** AT125307 (T) — 1995-08-15
- 6 Detection of viruses by amplification and hybridization.**  
**Inventor:** SNINSKY JOHN JOSEPH [US] ; KWOK      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
SHIRLEY LEE [US] (+1)  
**EC:** C12Q1/70B6; C12Q1/70; (+1)      **IPC:** C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/569; (+7)  
**Publication info:** AT127857 (T) — 1995-09-15
- 7 PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME**  
**Inventor:** GELFAND DAVID H [US] ; STOFFEL      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
SUSANNE [US] (+2)  
**EC:** C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)      **IPC:** C12N15/09; C11D3/386; C12N1/21; (+15)  
**Publication info:** AT135741 (T) — 1996-04-15
- 8 METHOD FOR HLA DP TYPING**  
**Inventor:** ERLICH HENRY A [US] ; HORN      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
GLENN T [US] (+2)  
**EC:** C12Q1/68M4      **IPC:** C12N15/09; A61K39/00; A61K49/00; (+14)  
**Publication info:** AT140035 (T) — 1996-07-15
- 9 HIGH TEMPERATURE REVERSE TRANSCRIPTASES**  
**Inventor:** GELFAND DAVID H [US] ; MYERS      **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
THOMAS W [US]  
**EC:** C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2)      **IPC:** C12N15/09; C12N9/12; C12Q1/68; (+5)  
**Publication info:** AT151112 (T) — 1997-04-15

- 10 Apparatus and method for performing automated amplification of nucleic acid sequences and assays using heating and cooling steps.**  
Inventor: JOHNSON LARRY JAMES [US] ; Applicant: PERKIN ELMER CORP [US]  
LEATH RICHARD ALAN [US] (+4)  
EC: C07H21/00C4; B01J19/00C; (+1) IPC: C12N15/09; B01J19/00; B01L7/00; (+23)  
Publication info: AT152529 (T) — 1997-05-15
- 11 Purified thermostable enzyme and process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using said enzyme.**  
Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US] ; Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
HORN GLENN [US] (+5)  
EC: C12P19/34; C12N9/12B7B7; (+1) IPC: C12N9/12; C12N9/96; C12N15/09; (+14)  
Publication info: AT154072 (T) — 1997-06-15
- 12 METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING**  
Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; BEGOVICH ANN B [US] (+4) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
EC: C12Q1/68M4 IPC: C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68  
Publication info: AT164630 (T) — 1998-04-15
- 13 Process for amplifying nucleic acid sequences.**  
Inventor: MULLIS KARY BANKS [US] Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
EC: C12N15/10; B01L7/00D; (+2) IPC: C12N15/09; B01L7/00; C07K14/805; (+14)  
Publication info: AT165869 (T) — 1998-05-15
- 14 RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA POLYMERASE**  
Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; LAWYER FRANCES C [US] (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2) IPC: C12N15/09; C07H21/04; C12N1/21; (+16)  
Publication info: AT169337 (T) — 1998-08-15
- 15 THE REDUCTION OF NON-SPECIFIC AMPLIFICATION DURING IN VITRO NUCLEIC ACID AMPLIFICATION USING MODIFIED NUCLEIC ACID BASES**  
Inventor: SNINSKY JOHN J [US] ; GELFAND DAVID H [US] (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]  
EC: C12N9/12B7B49; C12Q1/68D2A; (+1) IPC: C12N9/00; C12N9/12; C12N15/09; (+10)  
Publication info: AT176002 (T) — 1999-02-15

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-505625

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)6月30日

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C12Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

A 7823-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平4-502862  
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)12月6日  
(85) 翻訳文提出日 平成4年(1992)8月6日  
(86) 国際出願番号 PCT/US91/09294  
(87) 国際公開番号 WO92/10589  
(87) 国際公開日 平成4年(1992)6月25日  
(31) 優先権主張番号 623,098  
(32) 優先日 1990年12月6日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 エフ. ホフマン - ラ ロシュ アーゲ  
スイス国シーエイチ-4002 バーゼル グ  
レンツアーヘルストラッセ 124  
(72) 発明者 アーリッヒ, ヘンリー エイ.  
アメリカ合衆国94602 カリフォルニア州  
オークランド, ローダ アベニュー 3936  
(72) 発明者 ベゴビッチ, アン ビー.  
アメリカ合衆国94350 カリフォルニア州  
エル セリト, ロックウェイ アベニュー  
7306  
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

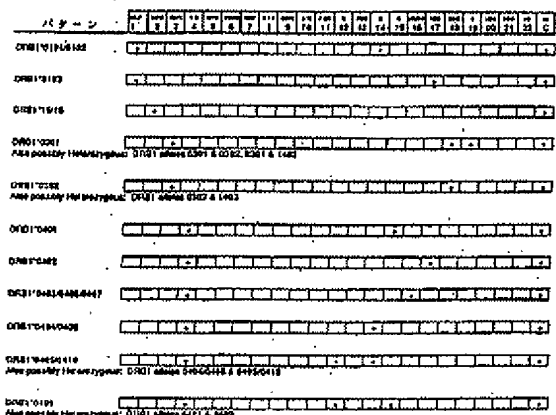
(54) 【発明の名称】 HLA DRβのDNAタイピングのための方法および試薬

(57) 【要約】

HLA DRβ遺伝子第二エクソンの特異的核酸配列の増幅用プライマーおよびその増幅されたDNA中に含有される多形配列の同定用プローブを、様々な起源のホモ接合体またはヘテロ接合体サンプルの型の判定および血清学的方法では識別できない対立遺伝子変異体の検出に使用できる。このHLA DRβ DNAの型判定システムは、実施が迅速かつ簡便で、分単位で検出可能なシグナルを生成するドットプロットフォーマットに使用でき、組織の型の判定、固体の同一性の決定、および疾患への感受性の同定に応用できる。

DRβ1 タイプパターン

アロップ





特表平6-505625 (3)

(SEQ ID NO:78), CRX56 (SEQ ID NO:77), CRX67 (SEQ ID NO:78), CRX80 (SEQ ID NO:79), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX68 (SEQ ID NO:84), GH54 (SEQ ID NO:85), GH58 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), GH122 (SEQ ID NO:93), および GH125 (SEQ ID NO:94) からなる「請求項15」記載の方法

17. サンプルの血清分画が CR10w1, CR10w2, CR2, CR40w4, CR40w10, CR40w13, CR40w14, CR40w15, CR3, CRw11, CRw8, CRw11.1, CRw11.2, CRw12, CRw8.3, CRw13, CRw14, CRw14w8, CR7, CRw8.1, CRw8.2, CR3, および CRw10タイプからなる群より選ばれるその血清分画を決定する方法において、

(a) サンプル中のCR81核酸を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

18. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX05 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:76), CRX68 (SEQ ID NO:79), CRX69 (SEQ ID NO:82), GH58 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項17」記載の方法

19. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX05 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:76), CRX68 (SEQ ID NO:79), CRX69 (SEQ ID NO:82), GH58 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群よりなる「請求項18」記載の方法

20. A854 (SEQ ID NO:81), A882 (SEQ ID NO:84), A883 (SEQ ID NO:86), G8258 (SEQ ID NO:85), DR260 (SEQ ID NO:95), DR17 (SEQ ID NO:73), DR30 (SEQ ID NO:107), DR182 (SEQ ID NO:228), CRX11 (SEQ ID NO:62), および CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプライマー

ID NO:144), DR203 (SEQ ID NO:278), DR163 (SEQ ID NO:239), DR118 (SEQ ID NO:194), DR302 (SEQ ID NO:81), DR338 (SEQ ID NO:116), DR8222 (SEQ ID NO:288), DR8232 (SEQ ID NO:308), DR138 (SEQ ID NO:212), DR198 (SEQ ID NO:274), および DR642 (SEQ ID NO:119) からなる「請求項2」記載の方法

25. サンプルが対立遺伝子0101, 0102, 0103, 1501, 1502, 1503, 1504, 1501, 1502, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0409, 0410, 04011, 1101, 1102, 1103, 1104, 8165, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1401, 1402, 1403, 1405, 0701, 0801, 0802, 0803, 0804, 0901, 1001, 1201, および1202からなる群より選ばれるDR1対立遺伝子からの核酸を含有するか否かを決定し、その核酸が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

(a) サンプル中のDR81核酸を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

26. 第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブは、CRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:90), GH66 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX68 (SEQ ID NO:84), CRX82 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

27. 第二のプローブのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:90), DR663 (SEQ ID NO:140), DR113 (SEQ ID NO:189), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX67 (SEQ ID NO:79), CRX58 (SEQ ID NO:77), DR186 (SEQ ID NO:272), DR197 (SEQ ID NO:273), DR8215 (SEQ ID NO:291), および DR8216 (SEQ ID NO:282), CRX60 (SEQ ID NO:75), GH125 (SEQ ID NO:94), DR180 (SEQ ID NO:268), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX69 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), および GH58 (SEQ ID NO:86), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX64 (SEQ ID NO:83), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX15 (SEQ ID NO:64),

21. DR818 (SEQ ID NO:87), DR20 (SEQ ID NO:88), DR21 (SEQ ID NO:89), DR827 (SEQ ID NO:106), DR831 (SEQ ID NO:108), DR832 (SEQ ID NO:109), DR833 (SEQ ID NO:110), DR834 (SEQ ID NO:111), DR835 (SEQ ID NO:112), DR838 (SEQ ID NO:113), DR837 (SEQ ID NO:114), DR842 (SEQ ID NO:119), DR845 (SEQ ID NO:122), DR846 (SEQ ID NO:123), DR848 (SEQ ID NO:125), DR860 (SEQ ID NO:148), DR884 (SEQ ID NO:160), DR890 (SEQ ID NO:186), DR891 (SEQ ID NO:187), DR895 (SEQ ID NO:171), DR8100 (SEQ ID NO:176), DR8101 (SEQ ID NO:177), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8103 (SEQ ID NO:179), DR8107 (SEQ ID NO:183), DR8108 (SEQ ID NO:184), DR8109 (SEQ ID NO:186), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR8113 (SEQ ID NO:189), および DR8118 (SEQ ID NO:184) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプローブ

22. 第一のパネルのプローブは、DR801 (SEQ ID NO:76), GH104 (SEQ ID NO:90), DR848 (SEQ ID NO:123), DR845 (SEQ ID NO:125), DR8207 (SEQ ID NO:263), GH102 (SEQ ID NO:89), DR8208 (SEQ ID NO:285), DR820 (SEQ ID NO:88), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR807 (SEQ ID NO:84), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

23. 第二のパネルのプローブは、DR8223 (SEQ ID NO:229), DR837 (SEQ ID NO:144), DR8203 (SEQ ID NO:278), DR8163 (SEQ ID NO:239), DR8118 (SEQ ID NO:194), DR802 (SEQ ID NO:81), DR838 (SEQ ID NO:116), DR8222 (SEQ ID NO:288), DR8232 (SEQ ID NO:308), DR8138 (SEQ ID NO:212), DR8198 (SEQ ID NO:274), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

24. 工程(a)において用いられるプライマーは CRX28 (SEQ ID NO:87) および CRX29 (SEQ ID NO:88) であり、工程(c)において用いられるプライマーは CRX28 および CRX37 (SEQ ID NO:73) であり、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブDR801 (SEQ ID NO:76), GH104 (SEQ ID NO:90), DR846 (SEQ ID NO:123), DR848 (SEQ ID NO:125), DR8207 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), DR820 (SEQ ID NO:88), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR807 (SEQ ID NO:84), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなり、オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルはプローブDR8223 (SEQ ID NO:229), DR837 (SEQ

CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), GH58 (SEQ ID NO:87), および CRX33 (SEQ ID NO:69), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX06 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DR8181 (SEQ ID NO:257), CRX68 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項1」記載の方法

28. 工程(a)において用いられるプライマーは GH48 (SEQ ID NO:87) および GH50 (SEQ ID NO:88) であり、工程(c)において用いられるプライマーは A883 (SEQ ID NO:86) と A880 (SEQ ID NO:67), A882 (SEQ ID NO:84) と A880, A854 (SEQ ID NO:86) と A880, および GH48 (SEQ ID NO:87) と CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれる、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブCRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:90), GH58 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX82 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第二のプローブのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:90), DR863 (SEQ ID NO:140), DR113 (SEQ ID NO:189), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), DR196 (SEQ ID NO:272), DR197 (SEQ ID NO:273), DR8215 (SEQ ID NO:291), および DR8216 (SEQ ID NO:282), CRX60 (SEQ ID NO:75), GH125 (SEQ ID NO:94), DR180 (SEQ ID NO:268), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX69 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), および GH58 (SEQ ID NO:86), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX64 (SEQ ID NO:83), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX15 (SEQ ID NO:64), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DR181 (SEQ ID NO:257), CRX58 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX83 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

29. 工程 (a)において用いられるプライマーはGH48 (SEQ ID NO:67) およびGH50 (SEQ ID NO:68)であり、工程 (c)において用いられるプライマーはAB83 (SEQ ID NO:69)とAB80 (SEQ ID NO:67)、AB82 (SEQ ID NO:68)とAB80、AB84 (SEQ ID NO:68)とAB80、およびGH48 (SEQ ID NO:67)とCRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれ、オリゴヌクレオチドプローブのうちの1本はプローブCRX33 (SEQ ID NO:69)、GH104 (SEQ ID NO:80)、GH68 (SEQ ID NO:88)、GH59 (SEQ ID NO:87)、CRX49 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、GH122 (SEQ ID NO:93)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、CRX23 (SEQ ID NO:88)、CRX08 (SEQ ID NO:81)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX08 (SEQ ID NO:84)、およびCRX82 (SEQ ID NO:81) からなり、第二の本はパネルGH104 (SEQ ID NO:90)、DRB83 (SEQ ID NO:140)、DRB113 (SEQ ID NO:189)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX67 (SEQ ID NO:78)、CRX68 (SEQ ID NO:77)、DRB198 (SEQ ID NO:272)、DRB197 (SEQ ID NO:273)、DRB215 (SEQ ID NO:297)、およびDRB216 (SEQ ID NO:292)、CRX50 (SEQ ID NO:76)、GH125 (SEQ ID NO:94)、DRB180 (SEQ ID NO:256)、GH122 (SEQ ID NO:83)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、CRX23 (SEQ ID NO:86)、CRX06 (SEQ ID NO:81)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX68 (SEQ ID NO:78)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、CRX67 (SEQ ID NO:78)、CRX66 (SEQ ID NO:77)、およびGH56 (SEQ ID NO:86)、CRX61 (SEQ ID NO:80)、CRX84 (SEQ ID NO:83)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、CRX15 (SEQ ID NO:64)、CRX08 (SEQ ID NO:81)、CRX67 (SEQ ID NO:78)、CRX66 (SEQ ID NO:77)、GH69 (SEQ ID NO:87)、およびCRX33 (SEQ ID NO:69)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、CRX08 (SEQ ID NO:81)、CRX67 (SEQ ID NO:78)、DRB181 (SEQ ID NO:257)、CRX68 (SEQ ID NO:77)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH54 (SEQ ID NO:85)、CRX63 (SEQ ID NO:82)、CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

30. RAP05 (SEQ ID NO:312)、およびRAP06 (SEQ ID NO:313) からなる群より選ばれるプローブ

Immunol. Rev. 86:5 (1985) がある。

クラスII α および β 鎖は別の遺伝子によってコードされ、DR、DQ、および DP 遺伝子はその MHC の別の領域に位置する。DR 領域では、単一の DR 遺伝子座、または遺伝子座は非多形DR α 鎖をコードするが、DRB1、DRB2 (DRB8ともいわれる)、DRB3、DRB4、および DRB5 と命名された5つの異なる DR 遺伝子座が多形DR β 鎖をコードする。一部の遺伝子座はある種のハロタイプ上のみ存在し (たとえば DR2/ハロタイプ上DRB5)、さらに発現される DR 遺伝子の数もハロタイプ間で変動する (Bhatnagar: HLA-DRbeta genes vary in number between different DR-specificities, whereas the number of DRbeta genes is constant. J. Immunol. 135:2148, 1985 参照)。

同定された明らかに異なるDRB1対立遺伝子の数は増加を続けている。HLA 系因子についての WHO 命名委員会からの1989年報告では、34の明らかに異なるDRB1対立遺伝子が同定された。これらの対立遺伝子によって、血清学的DR特異性 DR1~DRw18 が現れるものと考えられている (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system, 1989" と題する文献, Immunogenetics 31:131-140, 1990 参照。参考として本明細書に導入する)。1990年の報告までに、同定されたDRB1対立遺伝子の数は45にまで上った (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system, 1990" と題する文献, Immunogenetics 33:301-309, 1991 参照。参考として本明細書に導入する)。本発明は、数種の新たに発見された対立遺伝子の配列を提供するものである。

DRB2遺伝子座 (現在はDRB2遺伝子座とよばれる) の対立遺伝子は、DR1、DR2、およびDRw10 ハロタイプ上に存在し、発現上発現されない (Erichs: Analysis of isotypic and allelotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments. "Immunology of HLA", Oupont 編, Springer-Verlag, New York, 1991 年刊参照)。

DRB3遺伝子座の対立遺伝子は、スーパータイプ特異性DRw52 (DRw52a, DRw52b, およびDRw52c) をコードし、DR3、DRw6、DRw11、DRw12、DRw13、DRw14、DRw17、ならびにDRw18 ハロタイプ上に存在する。

単一対立遺伝子を持つDRB4遺伝子座はDRw53 スーパータイプ特異性をコードし、DR4、DR7、およびDRw9ハロタイプ上のみ存在する (Gatsvaras: Structural

#### HLA DRB の DNA タイピングのための方法および試薬

##### 関連出願の特許参照

本出願は、1988年3月13日出願の現在放棄された一連番号第 839, 331号の一部継続出願である、1988年8月22日出願の現在放棄された一連番号第 889, 344号の一部継続出願である、1989年8月16日出願、係属中の一連番号第 491, 210号の一部継続出願である、1990年12月8日出願、係属中の一連番号第 623, 098号の一部継続出願であり、上記各出願は参考として本明細書に導入される。

##### 発明の背景

###### 発明の分野

本発明は、HLA DRB (DRB) 核酸の DNA タイピングのための方法および試薬に関する。本発明は、RNA またはcDNA調製からなるサンプルを含めた各種起源のホモ接合体またはヘテロ接合体サンプルのタイピング、および現在の血清学的、細胞学的、もしくは生化学的方法では識別できない対立遺伝子の検出を可能にする。本発明のタイピング系は、移植組織のタイピング、個体の同一性の決定、および疾患に罹患しやすい個体の同定を容易にする。したがって、本発明は、一般的に医学の分野、とくに医学的研究および診断の領域、法医学の分野、ならびに分子生物学の分野に応用される。

###### 関連技術の説明

HLA クラスII 蛋白質 HLA DR、HLA DQ、およびHLA DPは、ヒト染色体6の短腕上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の遺伝子によってコードされている。クラスII 蛋白質は、約34kDa および約29kDa からなるヘテロダイマー糖蛋白質である。クラスII 蛋白質は、マクロファージ、T細胞、活性化T細胞、および他の細胞タイプの表面上に発現し、抗原の結合およびヘルパーTリンパ球への提供に関与する (Giles & Capra: Structure, function, and genetics of the Human Class II molecules. Adv. Immunol. 37:1, 1985 参照)。さらに、クラスII 蛋白質は、成熟Tリンパ球に発現したT細胞受容体のレパートリーを決定することにより、特異的免疫応答に影響する。HLA クラスII 遺伝子および蛋白質の一般的な総説には、Trowsdale は: "Structure, sequence and polymorphism in the HLA D region",

relationships between the DRbeta1 and DRbeta2 subunits in DR4, 7, and w9 haplotypes and the DRw63 Q13 specificity. J. Immunol. 137:934, 1986 参照]。

DRB5遺伝子座の対立遺伝子は DR2/ハロタイプ上のみ存在する (Analysis of isotypic and allelotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments, 前出)。

クラスII DR抗原 (蛋白質) の多形は現在、経産婦から得られたアロ血清を用い、精製リシン/β2上微量細胞傷害試験で分類されている。また、さらに細かい特異性によるタイピングを可能にし、アロ反応性T細胞クローンの特異性、またはT細胞受容体のホモ接合体タイピング細胞 (HTC) による刺激に対する増殖応答に基づき、細胞タイピングプロトコールが開発されている。

これらの細胞ベースの分析では、さらに血清学的に定義される多くの抗原、たとえばDR4 の5つのDRサブタイプに細分類されるDR特異性が定義される (Gairns は: Sequence polymorphism of HLA DR B1 alleles relating to T cell recognized determinants. Nature 317:168, 1985 参照)。しかしながら、血清学および細胞性いずれのアッセイ操作も困難で、時間がかかる。制限フラグメント長多形 (RFLP) に基づくDNA タイピングプロトコールも開発されている (米国特許第 4,582,788号参照、この記載は参考として本明細書に導入する)。しかしながら、これらのRFLPに基づく分析は大量の高分子重DNA を必要とし、集中的な労力を要し、一方、有益な制限酵素の数が限られているので、得られる結果に限界がある。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の出現は、複雑なゲノムDNA の分析および操作を容易にした。PCR 法は、核酸のきわめて複雑な混合物に発現して、特異的な核酸の増幅を可能にし、米国特許第 4,893,195号、4,683,202号、4,689,818号、および4,685,186号、ならびに欧州特許公告第237,362号に詳細に記載されている。これらの記載は参考として本明細書に導入する。

PCR 法はまた、個体のクラスII HLA DNA のタイピングを容易にする。科学者らは、オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、これらのプライマーを異質のある配列の増幅に用いることにより、ゲノムDNA における DRB遺伝子座の多形の第二エクソンを検討してきた (Scharf は: Hux. Immunol., 22: 81, 1988 の "Sequence analysis of the HLA DRB and HLA DQB loci from three Pemphigus vulgaris

patients' と題する論文参照)。

PCR プライマーが制限酵素認識配列を含有する場合は、増幅されたDNA はシーケンシングベクターに直接クローン化することが可能で、増幅生成物のヌクレオチド配列を容易に決定できる (Scherfら: Hum. Immunol., 233:1076, 1988における "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence" と題する論文参照)。

増幅DNA はまた、配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) プローブを使用する検出方法によっても検出できる (Sekiら: Nature 324:18, 1988 による "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA DQalpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes" と題する論文参照)。

これらの進歩にもかかわらず、HLA DRB 遺伝子の複雑さにより、個体のHLA DRB DNAタイプを決定するための有益かつ効率的な手段の開発は妨げられてきた。本発明は、効率的かつ有益なDRB DNAタイプング法の要求に合致する新規な方法および試薬を提供するものである。一方、これらの新規な方法および試薬は、これまで知られていなかったDRB 遺伝子座の発見をもたらし、さらにこれらの遺伝子座は本発明の方法によって分類、同定することができる。

本発明のタイプングシステムは、cDNAから合成されたcDNAのタイプング、ならびに組織、トランスジェニックシステム、育的状態および細胞系における DRB遺伝子の発現のタイプングおよび研究に使用できる。DR抗原を表現しないが、または異常な血清活性を示す細胞、たとえば腫瘍細胞も、容易にタイプングできる。しかも、異常な起源のサンプル、たとえば古代のDNA、法科学サンプルで、EDAが分解してたり、きわめて微量しか分析に使用できなくても、型の判定が可能である。

PCR は標的DNA のフラグメントを百万倍にも増幅できるので、また本発明のシステムは PCR増幅試薬を使用するので、放射標識プローブを使用する必要がなく、西洋フサビニールオキシダーゼ (HRP) に共有結合させた非同位元素SSO で十分な検出感度を得られる。本発明の特異的に結合した HRP標識プローブの存在は、発色性染料または化学発光性基質による単純なドットプロットフォーマットにより、分単位で検出できる。

#### 発明の要約

図4は、DR4血清学的特異性で細胞系をサブタイプに分類するための HLA DRB DNA タイピング (例5参照) の結果を示す図であり、

図5は、DR3, DR6, DR8 および DR9の特異性をサブタイプに分類するための HLA DRB DNA タイピング (例6参照) の結果を示す図であり、

図6は、DRB 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例8参照) を表化したものであり、

図7は、多数の異なる細胞系のHLA DRB DNA タイピング (例6および7参照) の結果を示す図であり、

図8は、DR3 細胞系のHLA DRB DNA サブタイプング (例7参照) を示す図であり、

図9は、ヘテロ接合および他の異常なサンプルのHLA DRB DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例7参照) を表化したものであり、

図10は、HLA DRB DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものであり、

図11、12および13は、DRB 対立遺伝子型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、HLA DRB 型判定システム、および DRB対立遺伝子座を分析するための配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ (SSO) を提供する。本発明は、cDNA剪断を含む各種起源からのヘテロ接合サンプルのタイプングに使用でき、また血清学的方法では識別できない対立遺伝子座の検出に使用できる。このタイプングシステムは、実行が単純で迅速なドットプロットフォーマットを利用でき、検出可能なシグナルを分単位で検出速度で生成させることができ、組織のタイプングならびに個体の同一性および疾患への罹患しやすさの決定に価値が認められる。

本発明は、HLA DRB 対立遺伝子の検出および同定の方法を提供する。確認された明らかになるDRB1対立遺伝子の数は増加を続けている。WHO命名委員会からの1989年報告には、34のDRB1対立遺伝子を掲げられており、この対立遺伝子セットは、本明細書においては、以下1989対立遺伝子セットと呼ぶ。1990年の WHO命名委員会からの報告には46の対立遺伝子が掲げられ、この対立遺伝子セットは以下1990対立遺伝子セットと呼ぶことにする。本発明は、さらに7個の新たな発見

されたDRB1対立遺伝子座における未知の対立遺伝子の同定のためのプローブを含めた非同位元素配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) プローブ、ならびに血清学的方法では識別できない対立遺伝子を含めて HLA DRB対立遺伝子のタイプングのための迅速、単純かつ正確な系を同時に与える方法を実施するキットを提供する。本発明の一種は、サンプル中の核酸のDRB DNA型を決定する方法において、(a) DRB 遺伝子第二エクソンを含有するサンプル中の任意の核酸を増幅し、(b) 工程(a) で増幅された上記核酸を第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、(c) DRB 遺伝子第二エクソンの配列を含有するサンプル中の特異的サブセットの核酸を増幅し、(d) 工程(a) で増幅された上記核酸を第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、ついで(e) 工程(b) および(d) におけるプローブハイブリダイゼーションのパターンからサンプル中のDRB DNAの由来するDRB 遺伝子座を決定する工程からなる方法を提供する。

他の態様として、本発明はサンプルが、DR1, DR2, DR4, DR7, DR8, およびDR10型からなる群より選ばれる血清学的タイプのDRB1対立遺伝子の核酸を含有するか否かを決定する方法において、(a) サンプル中のDRB1核酸を増幅し、ついで(b) 工程(a) で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、この場合これらのプローブはDRB1第二エクソンのアミノ酸残基9-18をコードする独特の多形配列にハイブリダイズする方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、DRB 一般およびDRB1特異的増幅および検出 (例2参照) の結果を示す図であり、

図2は、DRB1特異的増幅および検出 (例2参照) の結果を示す図であり、

図3は、古典的血清型 DR1~DR10の HLA DRB DNAタイプング (例3参照) の結果を示す図であり、

された対立遺伝子の配列を提供する。

HLA クラスII遺伝子座で最も高度な多形性を示す DRB遺伝子座の多様性、および集団中でのこれらの遺伝子座における多数の対立遺伝子により、サンプル中の核酸が由来する特定の DRB遺伝子座および対立遺伝子の同定を困難にしている。本発明は、この決定を高い特異性をもって真偽し、そのサンプルが採取された特定の個体の同定を可能にする。さらに、この識別力は、本発明の法科学分野における応用を可能にするものである。

PCR (または他の増幅方法) をきわめて少量の DNA (または分解DNA) の増幅に使用することができるので、本発明は、異常な起源、たとえば口内粘膜、一本の毛、または保存された古代の標本のDNA のようなサンプルからのHLA DRB DNA の型の判定に使用できる。古代標本サンプルの場合には、有史以前起源のたとえば初期猿人の対立遺伝子の分析が可能である。

本発明の方法は、DRB 遺伝子座を表現しない細胞のDRB DNA 型の決定に使用できる。しかしながら、この方法はまた、DRB cDNAから合成されたcDNAのDRB DNA 型の決定にも適している。この方法は、様々な細胞系または組織における HLA DRBの発現の研究を容易にし、HLA DRB発現と形質転換、自己免疫、または他の健康状態に対する感受性との間に関連があるかどうかの決定に使用できる。

本発明の研究への利用可能性としては、直接的な臨床応用が明白である。MHCの遺伝子および遺伝子座物は個体の免疫学的状態に中心的役割を果たし、特定のMHC 遺伝子座物が疾患の抵抗性および感受性に関連している。本発明は、サンプル中のMHC DRB 遺伝子座物の測定を可能にし、本発明はまた、医学とくに医学的診断方法の分野に適用できる。

このシステムの識別力は、拒絶または移植片対宿主病の危険を最小限にするために極めて性格な HLA DRBマッピングが必須と思われる移植ドナーの型の判定に有用である (Poljackら: J. Clin. Immunol. 3:341, 1983)における "Mixed lymphocyte reactions for individuals with phenotypic identity for specific HLA DR determinants: The role of linkage disequilibrium and of specific DR and other Class II determinants" と題する論文参照)。疾患感受性に関する研究では、DRB 対立遺伝子座における単一のヌクレオチドの相違が医学的に重要なことが示されている (Scherfら: "Specific HLA-DRB and HLA-DRB1 alleles confer



susceptibility to Penicillium vulgaris". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:215, 1989  
 ならびに Kaponら, "Identification of HLA-Dw14 genes in DR4+ Rheumatoid  
 Arthritis". Lancet, 1992, 頁, 1988 (参照)。

上述の利益に加えて、本発明はまた、以前には知られていなかったDR対立遺伝子を同定する方法、および関連プライマー、プローブ、ならびに DR8対立遺伝子の同定方法を提供する。このタイピングシステムを使用する異株パターンの SSO プローブハイブリダイゼーションでは、"Baqit" 細胞系の DNAタイピングによって表示されるように（例7参照）、新しい対立遺伝子が同定される。この細胞系はDRB1遺伝子座において異株パターンのプローブハイブリダイゼーションを示し、現在はDRB1\*1103 [配列同定番号 (SEQ ID NO): 27] と命名された、以前には報告されていなかった配列が明らかになった。

同様にして、ライム病の患者のDRB1対立遺伝子の本発明の分析で、新しいパターン（プローブハイブリダイゼーション）が明らかになった。DRB1対立遺伝子配列は患者のゲノムDNA からクローニングされ、配列が決定された。患者のDRB1対立遺伝子の配列は、これまでに報告されているDRB1対立遺伝子とは異なり、新たに、DR\*LY10（また、DRB1\*LY10）と命名された。その患者における他の対立遺伝子はDRB1\*0402であった。DR\*LY10対立遺伝子は、5'-末端に、DRB1\*0801、\*0802、\*0803、および\*1201に、そして3'-末端に、\*1401に類似の配列の領域を持つ。本発明は、DR\*LY10対立遺伝子を他のDR8対立遺伝子から識別するためのプローブを提供する。DR\*LY10対立遺伝子は、現在はDRB1\*1404 (SEQ ID NO: 40) と命名されている。

他の新たに発見されたDRB1遺伝子座のDRB1対立遺伝子は、最初DR\*PEVと命名されたDRB1\*1305 (SEQ ID NO: 39)、DRB1\*1303 (SEQ ID NO: 34)、および最初はDRB1\*0803と命名されたDRB1\*1105 (SEQ ID NO: 29) である。いずれも、本発明の方法による分析が新たなパターン（プローブハイブリダイゼーション）を明らかにした場合に発見された。ついで各対立遺伝子も配列分析を行ったところ、新規なハイブリダイゼーションパターンを生じる配列変異が明らかになった。本発明は、新たに発見された対立遺伝子を他のDR8対立遺伝子から識別するためのプライマーおよびプローブを提供する。

本発明はまた、本発明のDR8タイピング法の実施をより便利にするためのキッ

トを提供する。一種のキットは、増幅およびタイピングの両試薬を含む。他のキットは、本発明の1種または2種以上のDR8プローブのみを含む。いずれのキットにおいても、プローブは凍結されているかまたは乾燥されているか、または固体支持体に結合されているか、またはプライマーをキット中に入れる場合は、検出を容易にするため、すなわち、シグナル増強試薬の結合または固定のために凍結することができ、キットにはまた、プローブハイブリダイゼーションを容易にするための試薬、すなわち染色性基質DR およびストレプトアビジンを含む。フサビエルオキシダーゼを含むことができる。要約すれば、本発明の方法の真価に資する試薬は、本発明の利用を促進する任意の配置でパッケージ化できる。

各対立遺伝子の第二のエクソンのヌクレオチド配列は、コードされるアミノ酸配列とともに、配列掲載部に示す。以下の表1および2には、1988対立遺伝子セットにおける対立遺伝子の相当するヌクレオチド配列情報と、比較が容易な形式で掲げる。表1にはまた、対立遺伝子 DRB1\*0101 の核酸配列、ならびにコードされるアミノ酸配列を三文字および一文字の両コードで示す。同様に、表2には、相当するアミノ酸配列情報を一文字コードを用いて示す。各対立遺伝子の配列同定番号 (SEQ ID NO) を以下に示す。DRB1\*1603、DRB1\*0303、およびDRB1\*1105を除き、すべての対立遺伝子は、1990年 WHO命名委員会報告（上述、1990対立遺伝子セット）に掲載されている。DRB1\*1603の配列については、Desmetopoulos B: Hum. Immunol. 30:41-44, 1991 も参照されたい。

表1、2および3に掲載されない対立遺伝子のヌクレオチド配列は、配列掲載部のほかに、以下の表8に掲げる。

対立遺伝子	SEQ ID NO:	対立遺伝子	SEQ ID NO:
DRB1*0101:	SEQ ID NO: 1	DRB1*1201:	SEQ ID NO: 30
DRB1*0102:	SEQ ID NO: 2	DRB1*1202:	SEQ ID NO: 31
DRB1*0103:	SEQ ID NO: 3	DRB1*1301:	SEQ ID NO: 32
DRB1*0301:	SEQ ID NO: 4	DRB1*1302:	SEQ ID NO: 33
DRB1*0302:	SEQ ID NO: 5	DRB1*1303:	SEQ ID NO: 34
DRB1*0303:	SEQ ID NO: 6	DRB1*1304:	SEQ ID NO: 35
DRB1*0401:	SEQ ID NO: 7	DRB1*1305:	SEQ ID NO: 36
DRB1*0402:	SEQ ID NO: 8	DRB1*1401:	SEQ ID NO: 37
DRB1*0403:	SEQ ID NO: 9	DRB1*1402:	SEQ ID NO: 38
DRB1*0404:	SEQ ID NO: 10	DRB1*1403:	SEQ ID NO: 39
DRB1*0405:	SEQ ID NO: 11	DRB1*1404:	SEQ ID NO: 40
DRB1*0406:	SEQ ID NO: 12	DRB1*1405:	SEQ ID NO: 41
DRB1*0407:	SEQ ID NO: 13	DRB1*1501:	SEQ ID NO: 42
DRB1*0408:	SEQ ID NO: 14	DRB1*1502:	SEQ ID NO: 43
DRB1*0409:	SEQ ID NO: 15	DRB1*1503:	SEQ ID NO: 44
DRB1*0410:	SEQ ID NO: 16	DRB1*1601:	SEQ ID NO: 45
DRB1*0411:	SEQ ID NO: 17	DRB1*1602:	SEQ ID NO: 46
DRB1*0701:	SEQ ID NO: 18	DRB2*0101:	SEQ ID NO: 47
DRB1*0801:	SEQ ID NO: 19	DRB3*0101:	SEQ ID NO: 48
DRB1*0802:	SEQ ID NO: 20	DRB3*0201:	SEQ ID NO: 49
DRB1*0803:	SEQ ID NO: 21	DRB3*0202:	SEQ ID NO: 50
DRB1*0804:	SEQ ID NO: 22	DRB3*0301:	SEQ ID NO: 51
DRB1*0901:	SEQ ID NO: 23	DRB4*0201:	SEQ ID NO: 52
DRB1*1001:	SEQ ID NO: 24	DRB5*0101:	SEQ ID NO: 53
DRB1*1101:	SEQ ID NO: 25	DRB5*0102:	SEQ ID NO: 54
DRB1*1102:	SEQ ID NO: 26	DRB5*0201:	SEQ ID NO: 55
DRB1*1103:	SEQ ID NO: 27	DRB5*0202:	SEQ ID NO: 56
DRB1*1104:	SEQ ID NO: 28		
DRB1*1105:	SEQ ID NO: 29		

以下の表1、2および3では、最近同定されたPEV およびLY10対立遺伝子を除いて、すべての配列は、上述の1990年 WHO HLA命名委員会報告に掲載されている。DRB1\*0101ヌクレオチド配列はコンセンサス配列として動く。コンセンサス配列についての推定アミノ酸配列はヌクレオチド配列の上部に一および三文字コードで記載する。配列ホモロジーは横線で提示し、文字は多形位置を示す。表中のアラインメントの右端に記載した設計 SSOプローブおよびプライマーは、四角で囲った配列の領域と同一の配列であるか、またはそれと相補性である。アラインメントの端に2つの名前がある場合は、最左端の名前が最左端の四角に相当し、最右端の名前が最右端の四角に相当する。プローブ0812は、すべてのDR8対立遺伝子に示された領域にハイブリダイズされる。

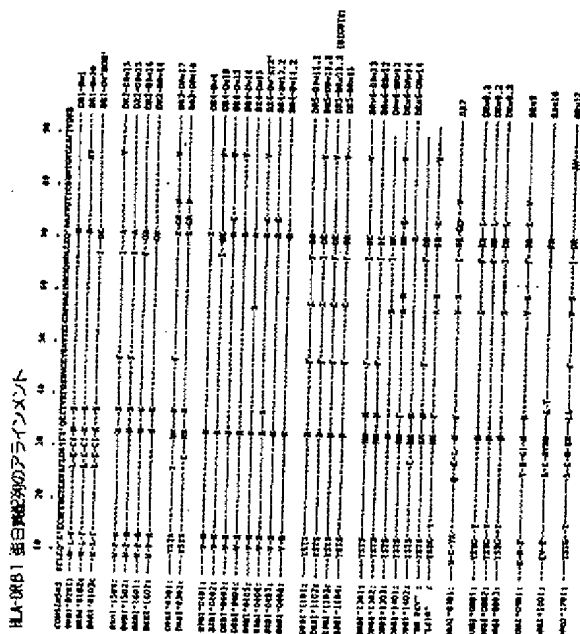
A、BおよびCと命名された3部からなる表1には、DR特異性DR1~DR18に相当する35 DR1対立遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

表2は、DRB2、DRB3、DRB4、およびDRB5遺伝子座の対立遺伝子についてのヌクレオチド配列アラインメントを示す。DRB1対立遺伝子の配列多形の主要領域は、アミノ酸位置9-18、25-34、67-74、および88に属し、第二のエクソン配列の終端は比較的不変である。

表3には、DR8対立遺伝子によってコードされる推定アミノ酸配列アラインメントを示す。アミノ酸配列の分析から、数種の異なる対立遺伝子に見出される特定の多形配列をもつ複雑な、しかし限定されたパターンの多形が明らかになった。しかしながら、一部の多形配列は各対立遺伝子に独特である。DR1、DR2、DR4、DR7、DR9、およびDRw10対立遺伝子はそれぞれ、DRB1遺伝子座最初の超可変領域（位置9~16）に独特の多形配列を有し、これはSSOタイピングによる血清学的DR特異性の決定に使用できる。これに対し、DR3、DRw11、およびDRw6対立遺伝子は、多形エピソード "Y9TS" を共有し、この領域のプローブ単独では識別できないが、各対立遺伝子の他の位置における多形によって識別可能である。同様に、DRw8とDRw12も、この領域では識別できない。



表3



Time	Temp	Pressure	Flow	Conc	Yield	Notes
0.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	Start
0.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.60	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.70	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.80	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
0.90	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.60	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.70	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.80	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
1.90	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.60	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.70	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.80	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
2.90	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.60	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.70	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.80	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
3.90	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.60	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.70	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.80	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
4.90	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.00	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.10	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.20	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.30	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.40	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00	
5.50	25.0	1.00	1.00	0.00	0.00</	

表 5: 第二のパネルの HLA-DQB1 ダイビング SSO プローブ

表4: 第一のパネルのHLA DRBタイピングSSOプローブ

グループ	SEQ ID NO:	モチーフ	HT-A DBR 対応塩基子 (20913)	添成 (20914)
CRX69	SEQ ID NO: 79	"W-L-S"	0101, 0102, 0103	0.4%, 43
OH105	SEQ ID NO: 91	"Q-D-V"	52835	0.1%, 43
OH104	SEQ ID NO: 90	"W-P-R-V"	1501, 1502, 1601, 1603	0.2%, 42
OH159	SEQ ID NO: 87	"V-S-H"	0401-0408	0.2%, 42, 39
CRX08	SEQ ID NO: 81	"I-D-S"	0103, 0402, 1101, 1301, 1302	0.1%, 42
OH122	SEQ ID NO: 93	"E"	1101, 1102, 1103, 1104	0.2%, 42
CRX23	SEQ ID NO: 66	"A-H-I"	1401, 1404 "L-V-I"	0.1%, 42
CRX23	SEQ ID NO: 61	"P-D-R"	1601, 1101, 1104, DR "P-E-V", 0801, 0802	0.2%, 42
CRX49	SEQ ID NO: 74	"G-V-K"	0701, 0702	1.6%, 42
OH101	SEQ ID NO: 89	"Y-T-S"	0401, 0402, 0403, 1301, DR "L-V-I", 1404	0.1%, 48
OH111	SEQ ID NO: 92	"K-D-S"	0901	0.4%, 42
CRX34	SEQ ID NO: 70	"S-V"	1001	0.4%, 42
CRX04	SEQ ID NO: 60	"R"	0101, 0103, 0403, 0404, 0601, 0405, 0607, 0808, 1402	0.1%, 42
OH14	SEQ ID NO: 86	"Y-T-S"	0701, 0702, 1101-1104, 1301-1303, 1401, 1402, DR "P-E-V"	0.2%, 42
CRX08	SEQ ID NO: 84	"H-D-E"	1153	0.2%, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB "ALL"	全HT-A DBR 対応塩基子	0.2%, 42

700-7	REQ ID NO:	エドワード	対応係子 (DR19)	数量 (SQPS C)
CR115	REQ ID NO: 64	"Y"	0301	0.2X, 50
CR250	REQ ID NO: 75	"K-GR"	0301, 0302	0.2X, 50
CR253	REQ ID NO: 70	"K"	0401	0.5X, 35
CR215	REQ ID NO: 64	"R-E"	0403, 0406, 0407	0.4X, 35
CR265	REQ ID NO: 83	"T-DK"	1303	0.2X, 40
CR253	REQ ID NO: 83	"T-DR"	0803, 1201	0.2X, 40
CR261	REQ ID NO: 80	"F"	0405, 1301, 0801, 0803	0.1X, 42
CR54	REQ ID NO: 83	"V"	0701, 0901, 1101	0.2X, 42
CR256	REQ ID NO: 80	"Q"	0101, 0307, 0302, 0401, 0405, 0407, 1204, 1101, 1202, 1303, 0711, 0901, 1001, 1402, DR "FEV", 0801, 0702, 0603, 1502, 1601, 1602	0.1X, 42
CR257	REQ ID NO: 78	"V"	0301, 0402, 0403, 0404, 0406, 1102, 1103, 1104, 1301, DR "CY10", 1401, 1501	0.1X, 43
CR212	REQ ID NO: 63	DR "ALL"	余元A-DR 対応係子	0.2X, 42

表1に示すブローブについては、SSPE洗浄液はすべて、0.1% SDS を含有する。さらに、a の配置を付したブローブは、プライマー-GH46/CRX37でのDR1特異的増幅を要求する。CRX16は42℃ではなく、50℃でハイブリダイズさせる。各ブローブは5'-末端でHRPに接合させる。ブローブ CRX58およびCRX57はそれぞれ、エプトルブ<sup>®</sup> およびエプトルブ<sup>®</sup> 対立遺伝子とは完全な相違を作らない。これ

らのプローブは、対立遺伝子より G 残基が 1 個少ないからである。DRX56 および DRX57 が欠く G 残基をきむように改良したプローブは本発明の範囲内に包含される。

本発明の目的では、「DRB1 特異的」プライマーは、DRB1 遺伝子の第 2 エクソンに隣接するイントロン配列にハイブリタイズし、他の DRB 遺伝子にハイブリタイズしない少なくとも 1 つのプライマーからなるプライマー対である。表 6 には、DR3 ハロタイプの DRB1 および DRB3 イントロンのヌクレオチド配列の、最後の 10 のコドンから 3' 下流イントロンの開始前までを示す。DRX37 (SEQ ID NO: 73) に下線を付す。実際の矢印はプライマーの延長方向を示す。重印は DRB1 および DRB3 イントロン配列の間での配列の相違を示す。3' 下流イントロンのセグメントは、配列掲載部に、SEQ ID NO: 314 (DRB1) および SEQ ID NO: 315 (DRB3) として掲げる。イントロンの上流配列は対立遺伝子配列内にある。

表 6

AA Seq:	Val Val Glu Ser Thr Thr Val Glu Arg Asn =	TCGACG
---------	---	--

表2  
34のHLA DRB1対立遺伝子 (1989セット) 中31を識別する  
SSOプローブの組み合わせ

DRB1	プローブ	DRB1	プローブ
0101	CRX06 + CRX08 + CRX56	1103	GH122 + GH56 + CRX37 + CRX08
0102	CRX06 + CRX04	1104	GH122 + GH56 + CRX35 + CRX37
0103	CRX06 + CRX06 + CRX56	1301	GH102 + GH54 + CRX03
0302	GH105	1301	GH56 + CRX06 + CRX37
0301	GH56 + GH113 + CRX30 + CRX37	1302	GH56 + CRX06 + CRX37
0303	GH56 + CRX30 + CRX35	1303	GH56 + CRX02 + CRX61 + CRX18
0401	GH59 + CRX31 + CRX56	1401	GH56 + CRX23 + CRX37
0402	GH59 + CRX06 + CRX37	1402	GH56 + CRX06 + CRX56
0403, 0404	GH59 + CRX15 + CRX37 + CRX04	DR*PREV	GH56 + CRX35 + CRX56
0404	GH59 + CRX04 + CRX31	0701	CRX48 + GH54 + CRX56
0405	GH59 + CRX04 + CRX61 + CRX56	0801	GH102 + CRX61 + CRX35 + CRX56
0407	GH59 + CRX15 + CRX36 + CRX04	0802	GH102 + CRX31 + CRX56
0408	GH59 + CRX04 + CRX35	0803	GH102 + CRX61 + CRX63 + CRX56
1101	GH122 + GH56 + CRX35 + CRX36	0901	GH111 + GH54 + CRX56
1103	GH122 + GH56 + CRX06 + CRX37	1001	CRX34 + CRX56
		DR*LV10	GH102 + CRX03 + CRX37

“HRP-SSO”と呼ばれる本発明の西洋ワサビペルオキシダーゼ複合SSOには、使用が簡単で検出可能なシグナルを迅速に（通常1～10分）生成する発色性または化学発光性基質を使用する検出方法が好まれる。HRP-SSOは4℃で保存すれば、活性の明らかな低下を伴うことなく2年以上にわたって安定である。PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, Gelfand, Shinsky & White 編, Academic Press, Inc., San Diego, 1990年) 中の Levenson & Chang (による “Nonisotopically labeled probes and primers” と題する論文を参照。放射線標識プローブも使用できるが、本発明によって与えられる重要な利益は優れた感度であって、その必要はない。

検出のためのドットプロットフォーマットは、多数のサンプルの迅速なタイピングを可能にし、HLA DRB1の対立遺伝子頻度の決定に有用である。PCR/SSO DRB1タイピング用に最近開発された変法に固定化逆相ドットプロットフォーマットが

化すると内部Pst I部位により 248bp産物が生成する。

すべてのハロタイプ (DR2, DR7, およびDR8を除く) からのDRB1対立遺伝子は、PCR プライマー-GH48およびCRX37によって特異的に増幅された。CRX37プライマーの配列を以下に示す。

CRX37 SEQ ID NO: 73 5'-GAATTCGGGGGCGGCGCGCT

GH48/CRX37プライマー対での増幅は 287bpフラグメントを産生する。プライマー-CRX37は 5'-末端にEcoR I制限エンドヌクレアーゼ認識配列を挿入してクロニングを容易にし、プライマー-GH48/GH50と異なり、このプライマーでの増幅およびBamH I/EcoR I消化は完全長 PCR産物の単離および分析を可能にする。

このような単離および分析は多くの場合、PCR産物のヌクレオチド配列の決定を含む。HLA DRB1対立遺伝子の配列決定には、1 μgの精製ヒトゲノムDNAをプライマー-GH48/GH50 およびGH48/CRX37を用いて増幅した。増幅されたDNAを、Scharfら:Hum. Immunol. 22:81, 1998 およびScharfら:Hum. Immunol. 23:1078, 1998 (これらの記載は参考として本明細書に導入する) に記載の方法によって、M13p10にクローニングした。挿入体を次に、Sangerら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:6463, 1977に記載のジデオキシシチンエーヌメーション操作 (1988年9月23日出願の米国特許出願第 248, 387号も参照。この記載は参考として本明細書に導入する) によって配列決定した。

上記表1および2に示した配列は、ゲノムクローニングにより (Hornら:Hum. Immunol. 21:249, 1988, 参照。この記載は参考として本明細書に導入する)、PCR増幅により (Erlichら:Immunobiology of HLA (du Pont編, Springer-Verlag, New York) 1989 年刊、およびScharfら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8215, 1989参照。この記載は参考として本明細書に導入する)、または文献 (WHO命名委員会: Immunogenetics 31:131, 1990; および Gregersonら: First domain diversity of DR and DQ subregion alleles in immunobiology of HLA (du Pont 編, Springer-Verlag, New York) 1989年刊参照) から得られたものである。

サンプルは、Tag ポリメラーゼ (Pfu, Norwalk, CT) 1.25単位 (2.5単位でなく) を反応容量 100 μl あたり加えたほかは上述の反応条件を用い、32サイクル (とくに指示のない限り) で増幅した。膀胱癌患者についてのcDNAを、HLA-DRB1遺伝

ある。Sekla:Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8230, 1989 および1989年5月4日出願の発明中の出願番号第 347, 486号参照。これは参考として本明細書に導入する。この操作においては、SSOプローブはフィルターに適用され固定されるので (フィルターに適用され固定される増幅DNAよりも)、「逆相ドットプロット」の題が使用される。

逆相ドットプロット操作によれば、単一のサンプルを、一連の固定化プローブを含有する膜と1回ハイブリダイズさせることで分析が可能となる。サンプルが使用プローブを認める場合 (たとえば、患者対コントロールまたは集団遺伝学研究) では情報のドットプロットフォーマットが有用である。逆相ドットプロットフォーマットは、臨床的、診断的、および法医学的分析の場合に価値がある。

逆相ドットプロットフォーマットは例1に詳細に記載する。以下の実施例は本発明の好ましい実施態様を例示するものである。この例は、本発明が、好ましい実施態様においては、多様な起源からの様々なサンプルについての単純、迅速かつ正確な DRB1タイピングを可能にするHLA DRB1タイピングのための非同位元素PCR/SSO システムを提供するものであることを示している。

#### 例1

##### 増幅および検出方法

プローブの第一のパネル (表4) でのサンプルのタイピングには、0.5 μgのヒトゲノムDNAを、Sekla:Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science 239:487, 1988; Scharfら:Hum. Immunol. 22:81, 1988; およびScharfら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8215, 1988に記載された反応成分を用いて増幅した。これらの文献は参考として本明細書に導入する。

HLA DRB1 一般的 PCRプライマーはGH48およびGH50である。これらのプライマーの配列を以下に示す。

GH48 SEQ ID NO: 67 5'-CCGGAATCTCTTCTGTCTCCCAACAGCAAG  
GH50 SEQ ID NO: 68 5'-CTCCCAACCCCTAGTGTGTCTCTCA

プライマーは反応混合物中に500nM存在させた。これらのプライマーは、272塩基対 (bp) フラグメントを生成し、PCR産物をクローニングするためのBamH IおよびPst I制限部位の配列を含有する。増幅DNAをBamH IおよびPst Iで消

子座で、報告されているように (Kawasaki: "Amplification of RNA" In PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら編, Academic Press, San Diego) 1989 参照) 増幅した。すべてのサンプルを滅菌滅油 (Sigma, St. Louis, MO) 100 μl で覆い、蒸気防止した。増幅後、滅油被覆液を 100 μl のグロブホルムで抽出した。

各サイクルの熱プロフィールは以下の温度での指示時間のインキュベーションとした。すなわち、94℃で45秒 (DNA解の活性化)、65℃で45秒 (プライマーのアニリング)、および72℃で45秒 (伸長) である。最終サイクルののちに、PfuIサーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT) は、最終の伸長が完全に行われることを確認するため、サンプルを72℃で10分間インキュベートするようにプログラムした。サンプルの交差検出を避けるための注意が必要である。とくに、一つのPCRの産物を非増幅サンプルと交差させることは防止しなければならない。1990年7月24日出願の米国特許出願第 557, 517号およびその出願の1990年11月2日付 CIP出願 (いづれも、参考として本明細書に導入する) には、非増幅サンプルに「キャリーオーバー」した PCR産物の増幅を防止する好ましい方法が記載されている。

増幅後、増幅DNAの小部分を変性し、一連のナイロンフィルターへのクロスリンクに適用した。各フィルターをついて膜プローブの一つにハイブリダイズした。各 SSOプローブは西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に共有結合で結合させ、発色性または化学発光性基質の存在下における非同位元素検出手段を提供する。ヌクレオチド配列、コードされたアミノ酸 (またはエピトープの可能性)、および固定されるDRB1、ならびに各プローブの洗浄条件を表4および5に掲げる。

すなわち、各増幅 DNAサンプル5 μl を、0.4M NaOH および 25mM EDTA からなる混合物 100 μl と混合し、得られた混合物を、ドットプロットマニフォールド (BioRad Richmond, CA) を用いて BioDyne Bナイロンフィルター (Pall Corp., Glen Cove, NY) に適用した。まだドットプロットマニフォールド中にあるフィルターを、10mM Tris-HCl および0.1mM EDTA からなる混合物 pH 8.0 で洗浄し、Whatman 3MM 濾紙で乾燥させた。Stratagene<sup>TM</sup> (Stratagene, La Jolla, CA) UV光線ボックスを用い、出力 65mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線照射により、DNAをナイロンフィルター上に固定化した。

他の記載がない限り、フィルターはすべて、2×SSPE (食塩リン酸ナトリウム EDTA), 5×デンハルト溶液および 0.5% SDS 中、ハイブリダイゼーション溶液 1 mlあたり 2 pmole の HRP-SSOプローブを用いて、42°Cで15分間ハイブリダイズした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合オリゴヌクレオチドは、Levenson & Chang: In PCR Protocol: A Guide to Methods and Application (Innistrum Academic Press, Inc., San Diego) および Sekiら: N. Eng. J. Med. 319: 537, 1988 の記載に従って製造された。各プローブのフィルターは 25 mlのSSPE溶液中、表4および5に示した温度で15分間 (他の記載がない限り) 洗浄した。

洗浄後、発色性の染料基質で展露すべきフィルターは、PBS中室温で30分間洗浄し、ついで 0.1 mgの 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) (Fluka) を 1 mlあたり、および 0.0015%の過酸化水素を含有する 100 mMクエン酸ナトリウム中に取り、緩やかに攪拌しながら室温で5〜15分間インキュベートした。展露したフィルターを PBS中ですすぎ、直ちに撮影した。化学発光検出系 (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL) で展露したフィルターは PBS中で5分間すすぎ、緩やかに攪拌しながら ECL溶液中に1分間置いた。ついで、フィルターは室温で1〜5分間×線に露出した。

## 例2

### DRB1特異的増幅

各種DRB1対立遺伝子を識別するDRB1遺伝子座の対立遺伝子の数種の多形配列は、他の DRB3遺伝子座の対立遺伝子にも存在する (表3参照)。DR3 DRB1対立遺伝子上のエピトープ "K-QR" (コドン71〜74) をコードするヌクレオチド配列がその例であり、この領域に対するプローブ (CRX50) は DRw1およびDRw6対立遺伝子からDR3 を識別できる。しかしながら、このエピトープは、DR3対立遺伝子DRw52a (DRB3\*101) によってもコードされ、一部のDRw6/ハロタイプおよび一部の DR3/ハロタイプ上にも同様に存在する。PCR プライマー-GH48/GH50 はすべての DR3遺伝子座を増幅するので、DR3遺伝子座においてDRw52aであったDRw6サンプルを、このプローブを用いて DR3サンプルから識別することは不可能である。

本発明は、DRB1遺伝子座のみを特異的に増幅する PCRプライマーを提供することによって、この問題を解決する。これらのプライマーの一つは、第二のエクソンからすぐ下流のイントロン領域にハイブリダイズする。イントロンは、DRB1

とDRB3遺伝子座を識別する配列を含有する。プライマー (CRX37) はDRB1イントロン配列に特異的にハイブリダイズし、このプライマーをGH48と組み合わせると大部分のハロタイプについて、DRB1特異的増幅を可能にする。

DRB1遺伝子座がこれらのDRB1特異的プライマー-塩対で増幅される唯一の遺伝子座であるかどうかを確認するために、DR2, DR3, およびDR4 HTC (ホモ接合タイプ) 細胞 DNAを、これらのプライマーおよびすべての DR3遺伝子座のための SSOプローブで増幅し、分析した。DRB1遺伝子座に加えて、DR2 ハロタイプはDRB2およびDR35遺伝子座を有し、DR3 ハロタイプはDRB3遺伝子座を有し、DR4 ハロタイプはDRB4遺伝子座を有する。結果は図1に示す。

これらの結果を得るには、約 200 ng の HTC DNA を一般的 DR3プライマーである GH48/GH50 またはDRB1特異的プライマー-GH48/CRX37によって増幅し、例1の記載のようにフィルターに適用した。増幅産物DNA (サンプル1〜4) を含有する各フィルターは図1に示すプローブとハイブリダイズさせた。各プローブがハイブリダイズする遺伝子座をカッコ内に示す。CRX39 はDR4, DR7, および DR8のDRB4遺伝子座にハイブリダイズする。CRX22 はDRB3対立遺伝子DRw52bにハイブリダイズする。

### SSO の配列:

CRX36 SEQ ID NO: 72 5'-CCCCCTCCCTCCCTCCA  
CRX32 SEQ ID NO: 65 5'-AAGCTCTCTTAAAGTCT

は、Scharfら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8215, 1989によって記載されている。この配列は参考に本明細書に導入する。

プローブGH91 (SEQ ID NO: 88, 5'-CTCCCTTTATGATGATAT) はDR8遺伝子座に特異的にハイブリダイズする。このプローブは例1に記載したようにハイブリダイズさせ、1×SSPE, 0.1% SDS 中、42°Cで15分間洗浄した。増幅されたサンプルは、(1) No DNA (陰性対照); (2) CR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; および (4) DR4 HTC "BSW" である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化ホリミネッセンスで検出された。

図1は、3つのHTC すべてのについてすべての DR3遺伝子座は一般的 DR3プライマーで増幅するが、DRB1特異的プライマーは DR3および DR4 HTCからのDRB1遺伝子座を増幅するのみであることを示している。興味あることに、DR2 HTC につ

いては、DRB2遺伝子座は、弱いとはいえ、DRB1特異的プライマーで増幅される。DRB1特異的プライマーは、図1および2に示すように、DR2, DR7, およびDR9を除き、試験されたすべてのDR/ハロタイプからのDRB1配列を効果的に増幅する。図2に示す結果を得るには、HTC からのゲノムDNA 約 0.5 μg を、DRB1特異的プライマー-GH48/CRX37で、HLA DRB について増幅した。増幅反応およびフィルターは、例1に記載したのと同様にした。各フィルター片は示したプローブの一つと、適当なハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズし、厳密条件下に洗浄した (表4, 5および7参照)。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、フィルターは発色性基質TMB で展露した。サンプルは、(1) DR1 HTC "KAS9003"; (2) DR1 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DRw11) HTC "SPOO10"; (6) DRw6 HTC "DMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DRw8 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DRw10 HTC "SHY" である。

図2の結果は、DR7 プローブ CRX49 ("G-YC") が、この実験では強く増幅されたDR7 HTC にはハイブリダイズしないことを示している。これらの結果から、完全なDRB1タイピングには一般的小さいDRB1特異的プライマーを使用できることが明らかである。

## 例3

### 血清DR型1〜10のタイピング

HTC からのゲノムDNA 約 0.5 μg を、HLA DRB について増幅した。3番および6番の各々すべてのサンプルは一般的プライマー-GH48/GH50 で増幅した。3番および6番のサンプルは、DRB1特異的プライマー-GH48/CRX37で増幅した。増幅反応およびフィルターは、例1に記載したのと同様にして準備した。各フィルター片は示したプローブの一つと、適当なハイブリダイゼーションおよび厳密条件下にハイブリダイズさせた (表4, 5および7参照)。プロービングおよび洗浄後に、フィルターは発色性基質TMB で展露した。サンプルは、

(1) DR1 HTC "KAS9003"; (2) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DRw11) HTC "SPOO10"; (6) DRw6 HTC "DMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DRw8 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DRw10 HTC "SHY" である。

図3は、古典的、血清学的に定義されたDR型1〜10についての、HTC のパネル

上でのDRタイピングの結果を示す。各古典的DR型の検出に単一のプローブを使用することができ、2つの異なる PCRプライマーが必要であった。DR3 およびDR6を除くすべてのサンプルで、一般的 PCRプライマー-GH48/GH50 が使用できる。この系列のDR3 およびDR6サンプルのDNA の増幅には、DRB1特異的プライマー-GH48/CRX37を使用した。DR3 HTC "QBL" (DRw17) 上の "Y" エピトープ (GH125; コドン26) を検出するために使用されたプローブは、DRw6サンプルの DR3対立遺伝子 (DRw52a) 上にも存在するからである。標準 DR3プライマーを使用されていたならば、"Y" プローブはDRw6サンプルにも同様にハイブリダイズしたと考えられる。

## 例4

### 一般的DRB1タイピング戦略

特定のサンプルのタイピングに関しては、一般的プライマーを最初の増幅に使用し、ついで増幅DNA を最初のパネルのプローブによってプロービングしなければならぬ (表4および7)。このパネルのプローブは大部分の血清型を特定するが、GH58 ("YSTS") はDRw8から DR3を明らかに識別しない。

GH58で陰性を示したサンプル、または特定のDR型の組合せ (たとえば、DR4 のDR型またはDRw8のサブタイプ) するサンプルには、第二のパネルのプローブ (表6) を使用しなければならない。上述のように、第二のパネルの一部のプローブは PCRプライマーのDRB1特異的対による増幅を要求する。第一および第二のパネルからのプロービングを組み合わせることにより、1989対立遺伝子セットにおける34のDRB1対立遺伝子中、31の識別ができる。これらの対立遺伝子の同定に用いられる SSOプローブの組み合わせを表8に示す。これらのプライマーおよびプローブによっては DR2サブタイプ (DRB1\*1601, \*1602, \*1601, および \*1602) は識別されず、これらのプローブによっては DRB1\*4033とDRB1\*4036 対立遺伝子は識別されない。

本発明の一つの DR2プローブは、DRB5遺伝子座の唯一の超可変領域 ("Q-D-Y") にハイブリダイズする配列からなる。DRB5遺伝子座はすべての既知 DR2/ハロタイプ上に存在し、それらのハロタイプ上にしか存在しないので、このようなプローブは、一般的 DR3プライマーで増幅した DR2の型の判定に信頼をもって使用できる。プローブGH104 ("W-P-R") はDR2 DRB1遺伝子座の第一の超可変領域にハイブリダイズし、一般的プライマーで増幅すると DR2 DNAに特異的にハイブリダイズす

る(図1)が、DR81特異的プライマーではハイブリダイスしない。これらの2つのプローブは一般的プライマーでの増幅においては、DR2の同一のインジケーターである。

## 例5

## DR4のサブタイピング

DR4 特異性のサブタイピングは血清学的には困難でない。サブタイプは二次抗原白質ゲル電気泳動および細胞性タイピングによって明らかにされたが、両方法とも繁殖で時間がかかる。Dw4, Dw10, Dw13, およびDw14は互いに、遺伝子の第三の超可変領域の位置70~74で異なっている。Dw15はまた、位置57にセリン("S")を有する。Dw13はまた、位置71にDw14およびDw15と同じアルギニン残基を有するが、位置74のグルタミン酸("E")で異なっている。

結果として、SSO プローブ、CRX04("R")はDw13, Dw14, およびDw15対立遺伝子にハイブリダイスする。これらの対立遺伝子を互いに識別するには、さらにプローブが必要である。SSO プローブ、CRX15("R-E")はDw13をDw14およびDw15から特異的に識別し、CRX61("S")はDw14からDw15を特異的に識別する。様々なDR81対立遺伝子(たとえばDw14, 1またはDw14, 2からのDR81+0403 またはDR81+0408)を識別する位置88の"G"対"V"多形はCRX56 プローブ("G") およびCRX57 プローブ("V")を用いて検出される(表5参照)。

DRタイプ1~10のHCT および5つのDR4 Dwサブタイプは、DR81特異的プライマー-GH46/CRX37で増幅し、6つの同一のナイロンフィルターに適用し、Dw型に特異的なHAP-SSO とハイブリダイスさせた。結果は図4に示す。

図4に示した結果を得るには、約 500 ng のHCT ゲノムDNA を上述のDR81特異的プライマー-GH46/CRX37によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図4に示すプローブとハイブリダイスさせた。サンプルは、列Aでは、

- (1) No DNA control; (2) DR1 HCT "KAS9003"; (3) DR2 HCT "SCHU"; (4) DR3 HCT "QBL"; (5) DR4 Dw4 HCT "SSM"; (6) DR4 Dw10 HCT "YAR"; (7) DR4 Dw13 HCT "SEA"; (8) DR4 Dw14 HCT "BM92"; (9) DR4 Dw15 HCT "LKT3"; (10) DR5 HCT "SPO010"; および(11) DRw6 HCT "OMW"; 列Bは (1) No DNA control; (2) DR7 HCT "MOU"; (3) DRw8 HCT "SPACH"; (4) DR9 HCT "DKJ"; および (5) DRw10 HCT "SHY"である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化学ルミネッセ

スで検出された。パネルAは、DR2, DR7, およびDRw9 HCTを除くすべてがCRX12 にハイブリダイスすることを示している。

パネルBは、CRX63 ガワ4 HCT BSM に特異的にハイブリダイスすることを示している。DR4 Dw4 のタイピングのための他のプローブには、DR8103 (G/G 10 NO 230)があり、例6に記載のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。スする。低い洗脱条件(2×SSPE, 5×デンハルト, 0.5% SDS, 42℃15分ハイブリダイゼーションおよび2×SSPE, 0.1% SDS, 42℃15分洗浄)では弱く強いシグナルを与える。DR4 Dw4のタイピングのためのさらに他のプローブは、以下に示すプローブCRX64 である。

CRX64 SEQ ID NO: 83 5'-ERP-QAGGAGAAACGCGCC-3'

HAP は西洋ワサビペルオキシダーゼである。I はイノシンで、これはプローブを不安定化する。

パネルCはDw10 HCT "YAR" の SSO CRX06("I-OE")による検出を示す。このプローブはHCT "OMW"にもハイブリダイスし、これはDR813 でありこの多形を共有する。

パネルDは CRX15の特異的ハイブリダイゼーションを示し、これはDR813サンプルJHA を、Dw14サンプルB102およびDw15サンプルLKT3から識別する。

パネルEは、CRX04 の、それぞれDw13, Dw14, およびDw15である JHA, BM92, およびLKT3へのハイブリダイゼーションを示す。CRX04 はDR81+0101 である。DR1 HCT KAS9003 にもハイブリダイスし、これらの3つのDw型とこの多形("R")を共有する。DR4 Dw14型は、サンプルがCRX15("R-E")またはCRX61("S")/パネルDのいずれにもハイブリダイスせず、CRX04("R")とハイブリダイスするプローブハイブリダイゼーションパターンから、推測される。パネルFは CRX01のDw16 HCT "LKT3" へのハイブリダイゼーションを示す。

図4は、一般的に、本発明が、第一のパネルのプローブへのハイブリダイゼーションのパターンにより、これらのプローブで増幅される多形領域を共有するサンプルを識別できることを示している。たとえば、"R" エピトープ特異的DR4 Dw型はGH59("V-H") 陽性およびCRX60("V-L-F") 陰性により DR1から識別され、DR4 Dw10は、GH59陰性およびGH58("YSTS") 陽性により DRw13から識別される。

表8は、このシステムが識別できない2つの DR4サブタイプがDR81+0403 およびDR81+0408 対立遺伝子であることを示している。これらの2つの対立遺伝子は

2つのパネルのプローブで同じハイブリダイゼーションのパターンを与える。位置37がDR81+0403 ではチロシン残基であるのに対し、DR81+0408 ではセリン残基である点を除いて、DR81+0408 はDR81+0403 と同一である。上に示したプローブの例示的パネルではこの多形は検出できないが、さらに追加的なプローブを使用すれば、完全な識別が可能となる。

## 例6

## DR3, DR5, DRw6, およびDRw8のサブタイピング

DR3, DR5, DRw6, および DRw8 の「スプリット」についてのサブタイプは、各ハロタイプの各種対立遺伝子型を識別するプローブの使用により、同定できる。たとえば、DRw17 およびDRw18 の両者は"K-R"プローブ CRX50にハイブリダイスするが、DRw17 のみが"V" プローブGH125 にハイブリダイスし、これとDRw17 は、DRw18 から識別できる。同様に、DRw11 およびDRw12 対立遺伝子(通常 DR6として分類される)は互いに、また3つのDRw8対立遺伝子から、プローブの別の組み合わせを用いて識別できる。

「一般的」血清型1~10のHCT と、同時にDR3, DR5, DRw6, および DRw8 サブタイプのHCT から、DR81特異的 PCRプライマー-CRX37/GH46で増幅した DNAを12のフィルターに適用した。これらのサンプルの血清型は既知であったから、本発明のこの態様を例示するために、これらの対立遺伝子のサブタイプの決定に必要なプローブのみを使用した。結果は図5に示す。

図5に示す結果を得るためには、約 500 ng のHCT ゲノムDNA をDR81特異的プライマー-GH46/CRX37によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図5に示すプローブとハイブリダイスさせた。サンプルは、列Aでは、(1) No

DNA control; (2) DR1 HCT "KAS9003"; (3) DR2 HCT "SCHU"; (4) DRw17 HCT "QBL"; (5) DRw18 HCT "RSH"; (6) DR4 HCT "SSM"; (7) DRw11 HCT "SPO010"; (8) DRw12 HCT "HERLUF"; (9) DRw13/DRw14 "KOS2"; (10) DRw14 HCT "AMALA"; (11) DRw13 HCT "SLB"; 列Bは (1) No DNA control; (2) DRw13 HCT "HAQ"; (3) DR PEY "BAR P"; (4) DR7 HCT "MOU"; (5) DRw13 HCT "TAB"; (6) DRw11 HCT "ARC"; (7) DRw12 HCT "SPL"; (8) DR9 HCT "DKB"; および (9) DRw10 HCT "SHY" である。

GH56("YSTS")がDR3, DR5, およびDRw6にハイブリダイスし、GH102("YST6")がDRw6にハイブリダイスすることを示す第一パネルのプローブのデータは図7に示

す(例7参照)。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。各サンプルにハイブリダイスするプローブのパターンを決定することにより(表8参照)、図6に示すように、サンプルは特異的な対立遺伝子に分類できる。図6には、プローブにハイブリダイスしたサンプルに+の記号を付してある。空欄は特定のプローブにハイブリダイスしなかったサンプルを示している。"KOS2"および"BARP"を除いて、すべてのサンプルがホモ接合体細胞であった。

DR3, DR5, DRw6, および DRw8 サンプルのハイブリダイゼーションデータおよびDR型は図6に示す。サンプル"KOS2"は血清学的にDRw6ハロタイプのホモ接合体と分類された(このサンプルはDw6 およびDw18と表示されていた)。しかしながら、それはDR81+1302 (CRX06+CRX58)およびDR81+1401 (CRX23+CRX57)と分類された。

サンプル"BARP"は血清学および MLCで DR4 Dw10 およびDRw6と分類される。したがって、"BARP"はプローブ CRX35およびCRX58("F-DR"および"G")にハイブリダイスし、これにより新たに発見されたDR PEY "DRw8対立遺伝子として分類され、またプローブ CRX06およびCRX57("I-OE"および"V")的にハイブリダイスして、DR4 Dw10対立遺伝子(DR81+0402) の存在を反映している。

## 例7

## 細胞系のDRタイピング

確立された細胞系の多くはクラスII分子を発現しないので、それらのDR型を血清学的に判定することは不可能である。ブラインドパネルとしてコードされた6つのクラスII陽性細胞系を一般的プライマーGH46/GH50で増幅し、第一のパネルのプローブ(表4)で調査し、サンプルの一般的血清型を確立した(図7)。

これらのおよび他の細胞系のDR型判定のためには、100 ngの細胞系DNAを一般的 HLA DRβプライマー-GH46/GH50により、30サイクルを行って増幅した。増幅された細胞系DNA(サンプルA~F)を含有する各フィルターを、一般的 HLA DRβプライマーで増幅した HCT DNAを含有する対照フィルター(サンプル1~11)と同時にハイブリダイスさせた。フィルターはすべて例1に記載のよきにして調査した。結果は図7に示す。各フィルター対は、示した SSOプローブにハイブリダイ

ズさせた。サンプルは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "B5M"; (6) DR5 (DRw11) HTC "SPOOIO"; (7) DRw6 HTC "OMW"; (8) DR7 HTC "MOU"; (9) DRw8 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DRw10 HTC "SHY"; (A) No DNA control; (B) R41; (C) 616; (D) Beguit; (E) RM3; および (F) RS225 である。

CRX12 プローブのシグナル強度は、すべてのサンプルが等しく良好に増幅されたことが明らかである。R41, RM3, および RS225は、DRw10 に特異的なプローブ CRX34 にハイブリダイズする。サンプル616 は、このサンプルが DR1対立遺伝子を有することと矛盾しない、プローブCRX60 ("MLF") およびCRX04 ("R") にハイブリダイズする。

細胞系 Beguit は、DR7 プローブCRX49 ("G-YK") および2つの他のプローブ、GH56 ("YSTS") およびGH122 ("E") にハイブリダイズし、それは DR7およびDRw11 であることが示唆される。しかしながら、このサンプルからの推測されるDRw11 対立遺伝子はCRX35 ("F-DE") DR81\*1101) またはCRX08 ("I-DE") DR81\*1102) のいずれかにハイブリダイズすることが期待されたが、以下にさらに述べるように、DRw11 の新規な変異体であることが示唆される。

通常のリン/核酸様を有する塩基によるこのサンプルは、この位置における多形の性質を決定するために、クローニングし、配列を決定した。対立遺伝子の配列決定により、エピトープ "F-DE" をコードする第三の超可変領域に突然変異、配列多形のあることが示された。この対立遺伝子はDR81\*1103 として分類された (表3の配列 "Beguit" 参照)。プローブCRX68 が第三の超可変領域のこの多形に特異的にハイブリダイズする (表4参照)。

他のサンプルすべてもGH56 "YSTS" プローブにハイブリダイズし、したがって、これらは、DR3, DRw11, またはDRw6でありうる。これらの他のサンプルは "E" プローブにハイブリダイズしないので、DR3 またはDRw6の可能性もある。しかしながら、このサンプルは、3つのDRw6対立遺伝子、DR81\*1301, DR81\*1302, およびDR81\*1401 に共通に存在する配列を認識する、プローブCRX08 ("I-DE") または CRX23 ("A-H") にハイブリダイズせず、DRw6ではなくDR3 であることが示唆される。

これを調べるために、このサンプルをDR81特異的プライマー-GH46/CRX37で増幅し、DR3, GH125 ("Y") およびCRX50 ("K-GR") について SSOで検査した。約100 ng の細胞系ゲノムDNA を、例1の記載のようにDR81特異的プライマー-GH46/CRX37で

増幅した。増幅産物DNA を含む各フィルター (サンプルA~F) をDR81特異的HLA DRB プライマーで増幅した HTC DNAを含有する対照フィルター (サンプル1~11) と同時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて例1に記載のようにして調製した。結果は図6に示す。各フィルター対は、示した SSOプローブにハイブリダイズさせた。サンプルは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "B5M"; (6) DR5 (DRw11) HTC "SPOOIO"; (7) DRw6 HTC "OMW"; (8) DR7 HTC "MOU"; (9) DRw8 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DRw10 HTC "SHY"; (A) No DNA control; (B) R41; (C) 616; (D) Beguit; (E) RM3; および (F) RS225 である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。

図6に示すように、R41, 616, RM3, およびRS225 は "Y" および "K-GR" の両者にハイブリダイズし、これはそれらをDR3 (DRw17) に分類させる。要約すると、R41, RM3, およびRS225 はDRw10/DRw17 として分類される。RM3 およびRS225 はR41に由来する細胞系であるから、それらが同じ DR3タイプを有しているも驚くべきことではない。細胞系616 はDR1/DRw17 として分類され、BeguitはDR7/DRw11 として分類されるが、上述のように、Beguit細胞系は "F-DE" エピトープを有するDR81\*1103 対立遺伝子を含有する。以前には、大部分の DRw11型細胞系は、"F-DE" エピトープを有するDR81対立遺伝子を含有することが認められていた。したがって、Beguit細胞系は DRw11型としては、異常なDR81対立遺伝子を含有する。

細胞系サンプルに加えて、3つの異なる起源からのDNA を増幅し、分類した。一つの起源は、Center for Study of Human Polymorphism (CEPH, Paris, France) からの一連の無関係なヘテロ接合体の精製ゲノムDNA である (サンプル 656~863)。他の起源は膀胱癌患者の癌組織のmRNAから作成したcDNAであった (サンプル2428, 2448, 2540, 2671, 2756)。正常ヒト膀胱細胞はクラスII分子を表現しないが、癌組織細胞ではクラスII分子の表現が記録されている。

残りのサンプル (PSY) は、口内癌で、DNA を精製することなく直接 HLA DRB について増幅した。完全なDRタイピングには、サンプルを一般的 DRBプライマー-GH46/50 およびDR81特異的 PCRプライマー-GH46/CRX37の両方で増幅する。一般的プローブで増幅された DNAサンプルを含有するフィルター片を第一の/パネルのプ

ローブ (表4) で検査し、DR81特異的に増幅した DNAサンプルを含有するフィルター片は第二の/パネルのプローブ (表5) で検査した。

表3および表8とのハイブリダイゼーションのパターンの比較により、サンプルの DRB型を明確に決定することができる。ヘテロ接合体サンプルの型判定の結果を図9に示す。図9では、プローブにハイブリダイズするサンプルは+の記号で示す。空欄はサンプルが特定のプローブとハイブリダイズしなかったことを指示する。

サンプル 656~863 はCEPHから提供された純粋なゲノムDNA である。サンプル "PSY" は口内癌癌から直接増幅されたサンプルである。このサンプルは 200ul の5% Chelex 中、95°Cに5分間加熱した (Ginger-Sear; Amplifications 3; 11, 1989)。この溶液約50ul を直接、反応容量 200ul 中で増幅させて、一般的DRB およびDR81特異的増幅反応をサンプルにつき30サイクル実施した。

サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2756は、膀胱癌cDNAブレインレーションから増幅した。膀胱癌サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2756は、SSO GH125, CRX60, CRX58, およびGH54では分析しなかった。これらのプローブは、DR81特異的プライマー-GH46/CRX37による増幅を要求するからである。CRX37 はイントロン配列に由来するので、cDNAの増幅には使用できない。NDは測定していない。

口内癌癌サンプル、PSY はDR46w14 (DR81\*0404) およびDRw11 である。

これらのデータは本システムによれば、様々な起源から、標準精製ゲノムDNA から、mRNAから合成されたcDNAから、異常な起源たとえば口内癌癌もしくは1本の毛からの、ヘテロ接合体DNA のタイピングが可能であることを示している。

#### 例2

##### DRB タイピング—逆ドットプロットフォーマット

本発明のこの実施形態においては、DRBプローブは膜に固定され、増幅された標的DNA は該結合プローブにハイブリダイズさせる。タイピングプローブのセットは、各プローブが、セット中の他のすべてのプローブと同じ濃度および塩濃度で特異的標的配列にハイブリダイズする (そして同じ洗浄条件でハイブリダイズしたままである) ように設計される。PCR Protocolと題する本 (他者として本明細書に導入する) に記載されているように、増幅に用いられる PCRプライマーは、膜に結合したプローブにハイブリダイズした増幅DNA が容易に検出できるように、

ビオチン化される。

一実施形態においては、検出は、膜結合プローブにハイブリダイズしたビオチン化、増幅DNA と、ストレプトアビジン (SA) 複合溶液でサビエルオキスターゼの反応によって行われる。すなわち、HRP はS-A-ビオチン相互作用を介して増幅されたDNA に結合され、よく知られた多様な手段での発色、たとえばテトラメチルベンジジンの酸化によるたとえば着色化合物の発生 (米国特許第 4,789, 030号参照。参考として本明細書に導入する) に使用できる。

プローブは膜に任意の手段で固定できるが、好ましい方法には、長さ約13~25のオリゴヌクレオチドプローブの、はるかに長い配列ポリ-dT による「テイリング」がある。生成したポリ-dT テイルは膜上のアミノ基と反応させてプローブを膜に共有結合で固定できる。この反応は紫外線照射によって促進される。

ターミナルデオキシリボヌクレオチドシラントランスフェラーゼ (TdT, Ret11ff 8/o chemicals; 以下の反応には約 120単位/ul, 100 pmol/ul に相当の濃度が規定される) はプローブ上にポリ-dT テイルを創製するために使用できる。またテイルをもつプローブは、市販の DNAシンセサイザーで合成することもできる。しかしながら、DNAシンセサイザーでテイルをもつプローブを作成する場合は、主としてテイル領域に望ましくない未熟チェーンターミネーションが起こらないように、プローブの5'末端にテイルを配置すべきである。

TdT反応は1 x TdT塩、200 pmolのオリゴヌクレオチド、800 uM dTTP、および600単位の TdTを含有する約 100 ul の容量で行われる。10 x TdT塩は 1000mM カコシル硫酸カリウム、10 mM塩化コリット、2 mMジチオスレイトール、250mM Tris-Gl, pH 7.6であり、Rochechouhury & Wu: Meth. Enzymol. 65:43-62 の記載に従い (この記載は参考として本明細書に導入する) 製造する。8 mM dTTP の10 x 保存溶液 (NaOHで pH 7に中和) を調製するのが便利である。

TdT 反応は37°Cで2時間行い、ついで 100ul の10 mM EDTA, PH 8の添加により停止させた。テイルをつけたオリゴヌクレオチドの最終濃度は1 uM (1 pmol/ul) であり、ホモポリマーテイルの長さは約 400塩基である。テイルの長さは dTTP とオリゴヌクレオチドのモル比を調整することによって変化する。テイルをもつプローブは使用時まで-20°Cで保存できる。

逆ドットプロットフォーマットには2種類の好ましいナイロン膜がある。すな





附表6-505625 (15)

DRB62	SEQ ID NO: 139	S	5'-GAGTCTCTGAGCCGAG	DRB100	SEQ ID NO: 176	S	5'-TTCTTGCACGAGATAAGTATGAG
DRB63	SEQ ID NO: 140	S	5'-CATCTCTGAGCAGCGCG	DRB101	SEQ ID NO: 177	S	5'-CTCCCTTTTATGATATGATC
DRB64	SEQ ID NO: 141	U	5'-ACCTCGCCGCCCTCTG	DRB102	SEQ ID NO: 178	S	5'-CACTACTCTCATCAGGC
DRB65	SEQ ID NO: 142	U	5'-GAGCAGAAAGCGCG	DRB103	SEQ ID NO: 179	S	5'-CTGTCCAGGTACCGCA
DRB66	SEQ ID NO: 143	U	5'-GAGXAGAAAGCGCGCG	DRB104	SEQ ID NO: 180	U	5'-ACCTCGCCGCCCTCT
DRB67	SEQ ID NO: 144	U	5'-CCTCGCCGCCCTCTG	DRB105	SEQ ID NO: 181	U	5'-GAGCGCCGCCAGGTGGAC
DRB68	SEQ ID NO: 145	U	5'-CCTCTCTGAGCGGAGG	DRB106	SEQ ID NO: 182	U	5'-AGAGCGCGCCAGGTGGAC
DRB69	SEQ ID NO: 146	U	5'-CGCTCTCTTCCAGGATG	DRB107	SEQ ID NO: 183	S	5'-AGAAAGCGCGCGCG
DRB70	SEQ ID NO: 147	U	5'-TTCTTGCACCGAGATAAGTATG	DRB108	SEQ ID NO: 184	S	5'-GAGCGCGCGCGCG
DRB71	SEQ ID NO: 148	S	5'-CGCTCTCTCTCCAGGATG	DRB109	SEQ ID NO: 185	S	5'-GAGACAGCGCGCGCGCTGG
DRB72	SEQ ID NO: 149	U	5'-AGAAAGCGCGCGCGGCTG	DRB110	SEQ ID NO: 186	U	5'-GCTCTGTCTTCCAGGAACTGC
DRB73	SEQ ID NO: 150	U	5'-GAGCAGAGAGCGCGCG	DRB111	SEQ ID NO: 187	U	5'-CTCAGACGTAGACTACTGC
DRB74	SEQ ID NO: 151	U	5'-GAGCAGAGAGCGCGCG	DRB112	SEQ ID NO: 188	S	5'-GCTCTCTCTGCGAGCACTGC
DRB75	SEQ ID NO: 152	U	5'-CTTCTCTCTCCAGGAGG	DRB113	SEQ ID NO: 189	S	5'-GAGCTCTCTGAGAGCAGG
DRB76	SEQ ID NO: 153	U	5'-CTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB114	SEQ ID NO: 190	U	5'-CCTCTCTCTCCAGGAGGTC
DRB77	SEQ ID NO: 154	U	5'-CTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB115	SEQ ID NO: 191	U	5'-ACCGCGGTTGTTGAGAGCTT
DRB78	SEQ ID NO: 155	U	5'-CCTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB116	SEQ ID NO: 192	U	5'-ACCGCGGTTGTTGAGAGCTT
DRB79	SEQ ID NO: 156	U	5'-CCTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB117	SEQ ID NO: 193	U	5'-ACCGCGGTTGTTGAGAGCTT
DRB80	SEQ ID NO: 157	U	5'-CCTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB118	SEQ ID NO: 194	S	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB81	SEQ ID NO: 158	U	5'-CTTCTCTCTCCAGGAGGTC	DRB119	SEQ ID NO: 195	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB82	SEQ ID NO: 159	U	5'-ACCTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB120	SEQ ID NO: 196	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB83	SEQ ID NO: 160	S	5'-GCGCGCGCGCTCTGCTC	DRB121	SEQ ID NO: 197	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB84	SEQ ID NO: 161	U	5'-GCGCGCGCGCTCTGCTC	DRB122	SEQ ID NO: 198	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB85	SEQ ID NO: 162	U	5'-GCGCGCGCGCTCTGCTC	DRB123	SEQ ID NO: 199	T	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA
DRB86	SEQ ID NO: 163	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT	DRB124	SEQ ID NO: 200	T	5'-CCACXCGCGCGCGCTCT
DRB87	SEQ ID NO: 164	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT	DRB125	SEQ ID NO: 201	T	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB88	SEQ ID NO: 165	U	5'-GAGCGCGCGCGAGCT	DRB126	SEQ ID NO: 202	T	5'-ACCGCGCGCGCGCTCT
DRB89	SEQ ID NO: 166	S	5'-AGAAAGCGCGCGCGCG	DRB127	SEQ ID NO: 203	T	5'-GAGCGCGCGCGAGCT
DRB90	SEQ ID NO: 167	S	5'-AGAAAGCGCGCGCGCG	DRB128	SEQ ID NO: 204	T	5'-ACCGCGCGCGCGCTCT
DRB91	SEQ ID NO: 168	U	5'-GCGCGCTTGTGAGAGCT	DRB129	SEQ ID NO: 205	T	5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB92	SEQ ID NO: 169	U	5'-GCGCGCTTGTGAGAGCT	DRB130	SEQ ID NO: 206	T	5'-GCGCGCTTGTGAGAGCT
DRB93	SEQ ID NO: 170	U	5'-ACCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB131	SEQ ID NO: 207	T	5'-CAAGAGAGAGAGCTTGC
DRB94	SEQ ID NO: 171	S	5'-CTCTCTGAGAGCAGAAAG	DRB132	SEQ ID NO: 208	T	5'-GAGAGAGAGAGAGAGCTTGC
DRB95	SEQ ID NO: 172	U	5'-GAGCAGAGAGCAGAAAG	DRB133	SEQ ID NO: 209	T	5'-GAGAGAGAGAGAGAGCTTGC
DRB96	SEQ ID NO: 173	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA	DRB134	SEQ ID NO: 210	T	5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB97	SEQ ID NO: 174	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA	DRB135	SEQ ID NO: 211	T	5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB98	SEQ ID NO: 175	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA	DRB136	SEQ ID NO: 212	T	5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB99	SEQ ID NO: 176	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB100	SEQ ID NO: 177	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB101	SEQ ID NO: 178	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB102	SEQ ID NO: 179	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB103	SEQ ID NO: 180	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB104	SEQ ID NO: 181	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB105	SEQ ID NO: 182	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB106	SEQ ID NO: 183	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB107	SEQ ID NO: 184	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB108	SEQ ID NO: 185	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB109	SEQ ID NO: 186	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB110	SEQ ID NO: 187	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB111	SEQ ID NO: 188	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB112	SEQ ID NO: 189	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB113	SEQ ID NO: 190	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB114	SEQ ID NO: 191	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB115	SEQ ID NO: 192	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB116	SEQ ID NO: 193	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB117	SEQ ID NO: 194	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB118	SEQ ID NO: 195	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB119	SEQ ID NO: 196	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB120	SEQ ID NO: 197	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB121	SEQ ID NO: 198	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB122	SEQ ID NO: 199	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB123	SEQ ID NO: 200	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB124	SEQ ID NO: 201	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB125	SEQ ID NO: 202	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB126	SEQ ID NO: 203	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB127	SEQ ID NO: 204	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB128	SEQ ID NO: 205	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB129	SEQ ID NO: 206	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB130	SEQ ID NO: 207	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB131	SEQ ID NO: 208	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB132	SEQ ID NO: 209	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB133	SEQ ID NO: 210	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB134	SEQ ID NO: 211	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB135	SEQ ID NO: 212	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB136	SEQ ID NO: 213	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB137	SEQ ID NO: 214	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB138	SEQ ID NO: 215	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB139	SEQ ID NO: 216	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB140	SEQ ID NO: 217	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB141	SEQ ID NO: 218	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB142	SEQ ID NO: 219	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB143	SEQ ID NO: 220	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB144	SEQ ID NO: 221	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB145	SEQ ID NO: 222	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB146	SEQ ID NO: 223	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB147	SEQ ID NO: 224	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB148	SEQ ID NO: 225	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB149	SEQ ID NO: 226	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB150	SEQ ID NO: 227	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB151	SEQ ID NO: 228	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB152	SEQ ID NO: 229	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB153	SEQ ID NO: 230	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB154	SEQ ID NO: 231	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB155	SEQ ID NO: 232	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB156	SEQ ID NO: 233	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB157	SEQ ID NO: 234	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB158	SEQ ID NO: 235	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB159	SEQ ID NO: 236	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB160	SEQ ID NO: 237	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB161	SEQ ID NO: 238	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB162	SEQ ID NO: 239	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB163	SEQ ID NO: 240	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB164	SEQ ID NO: 241	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB165	SEQ ID NO: 242	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB166	SEQ ID NO: 243	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB167	SEQ ID NO: 244	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB168	SEQ ID NO: 245	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB169	SEQ ID NO: 246	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB170	SEQ ID NO: 247	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB171	SEQ ID NO: 248	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB172	SEQ ID NO: 249	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB173	SEQ ID NO: 250	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB174	SEQ ID NO: 251	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB175	SEQ ID NO: 252	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB176	SEQ ID NO: 253	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB177	SEQ ID NO: 254	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB178	SEQ ID NO: 255	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB179	SEQ ID NO: 256	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB180	SEQ ID NO: 257	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB181	SEQ ID NO: 258	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB182	SEQ ID NO: 259	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB183	SEQ ID NO: 260	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB184	SEQ ID NO: 261	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB185	SEQ ID NO: 262	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB186	SEQ ID NO: 263	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB187	SEQ ID NO: 264	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB188	SEQ ID NO: 265	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB189	SEQ ID NO: 266	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB190	SEQ ID NO: 267	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB191	SEQ ID NO: 268	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB192	SEQ ID NO: 269	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB193	SEQ ID NO: 270	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB194	SEQ ID NO: 271	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB195	SEQ ID NO: 272	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB196	SEQ ID NO: 273	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB197	SEQ ID NO: 274	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB198	SEQ ID NO: 275	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB199	SEQ ID NO: 276	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB200	SEQ ID NO: 277	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB201	SEQ ID NO: 278	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB202	SEQ ID NO: 279	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB203	SEQ ID NO: 280	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB204	SEQ ID NO: 281	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB205	SEQ ID NO: 282	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB206	SEQ ID NO: 283	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB207	SEQ ID NO: 284	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB208	SEQ ID NO: 285	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB209	SEQ ID NO: 286	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB210	SEQ ID NO: 287	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB211	SEQ ID NO: 288	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				
DRB212	SEQ ID NO: 289	U	5'-GCGCGCGCTAGCGCGAGTA				

DRB213	SEQ ID NO: 289	5'-ATGACACTGCTCTTACGCTG
DRB214	SEQ ID NO: 290	5'-ACATCTCTGAAAGACGAG
DRB215	SEQ ID NO: 291	5'-CCGCTCCCTTCCCATTTGAA
DRB216	SEQ ID NO: 292	5'-TTCAATGAAAGACGAGCGG
DRB217	SEQ ID NO: 293	5'-CATCTCTGAAAGACGAG
DRB218	SEQ ID NO: 294	5'-GCTCTCTCTTCCAGCATG
DRB219	SEQ ID NO: 295	5'-CCCTCTCTTCCAGCATG
DRB220	SEQ ID NO: 296	5'-GCTCTCTCTCTGCTCTG
DRB221	SEQ ID NO: 297	5'-CTCTCTCTCTGCTCTG
DRB222	SEQ ID NO: 298	5'-CTCTCTCTCTGCTCTG
DRB223	SEQ ID NO: 299	5'-GGCGGCTCTGCTCTGCTG
DRB224	SEQ ID NO: 300	5'-CCACGCTCTCTCTCTCT
DRB225	SEQ ID NO: 301	5'-GAGGCGGCTCTCTCTCT
DRB226	SEQ ID NO: 302	5'-ACCGGCTCTCTCTCTCT
DRB227	SEQ ID NO: 303	5'-GAGGCTCTCTCTCTCTCT
DRB228	SEQ ID NO: 304	5'-ACCGGCTCTCTCTCTCT
DRB229	SEQ ID NO: 305	5'-ACTCTCTCTCTCTCTCT
DRB230	SEQ ID NO: 306	5'-GACCTCTCTCTCTCTCT
DRB231	SEQ ID NO: 307	5'-ACATCTCTCTCTCTCTCT
DRB232	SEQ ID NO: 308	5'-GACATCTCTCTCTCTCT
DRB233	SEQ ID NO: 309	5'-ACATCTCTCTCTCTCTCT
DRB300	SEQ ID NO: 310	5'-GAATTCCTCTCTCTCTCT
DRB301	SEQ ID NO: 311	5'-GAATTCCTCTCTCTCTCT

予備試験の結果、「S」とマークした上記プローブは他の「U」とマークした上記プローブよりも好ましいことがわかっている。「T」とマークした上記プローブはまだ試験されていない。

好ましい逆ドットプロットについてのハイブリダイゼーションパターンおよび特異性 (98%対立遺伝子セット) を以下に示す。「特異性」のカラムに使用される「X」のマークは、\*印の後の始めの2つの数字で指示されるすべての対立遺伝子を含むことを表す。

エントリ	名称	特異性
W1-F	CRX6NDK801	DRB1*0101, 0102, 0103
W1-R	CRX104	DRB1*1501, 1502, 1601, 1602
QDY	DRB100	DRB5*0101, 0102, 0201, 0202
K-D-F	CRX111	DRB1*0901
YTS	DRB46	DRB1*030X, 110X, 130X, 140X
YSTQ	CRX102	DRB1*080X, 1201
V-H	DRB49	DRB1*040X
G-YK	DRB19	DRB1*070X
EV	DRB20	DRB1*1001
I-R-S	CRX57	DRB1*0101
LL-S	CRX58	DRB1*0201, 0202, 0301
K-DR	DRB37/DRB109	DRB1*0801, 0802, 1101, 1104, 1601, PEV;
		DRB5*0101, 0102
F-DE	CRX68	DRB1*1103
I-DS	CRX104/DRB101	DRB1*0103, 0402, 1102, 1301, 1302
I-DK	DRB27	DRB1*1303
RR	DRB45	DRB1*1001
F-RR-F	DRB52	DRB1*0901
I-A	DRB53	DRB1*1501, 1502; DRB5*0201, 0202
Y	DRB103	DRB1*0301, DRB3*0101
E	DRB107	DRB1*110X
S	DRB40	DRB1*0405, 0801, 0803, 1203
A-H	DRB112	DRB1*1401, LY10
V-S	DRB35	DRB1*070X, 0901, 1201; DRB3*0101, 0301
R	---	DRB1*0101, 0102, 0404, 0405, 0408, 1402
K	---	DRB1*0401
R-B	---	DRB1*0403, 0406, 0407
RR-F	---	DRB1*1401, LY10; DRB4*0101
I-DR	DRB72	DRB1*0701, 0702
I-DR	DRB95	DRB1*0803, 1201
K-GR	---	DRB1*0301, 0302; DRB3*0101
DR	DRB113	DRB1*1602
G (pos. 86)	---	表 5 参照
V (pos. 86)	---	表 5 参照

エントリ	名称	特異性
AV (pos. 86)	---	DRB1*0103, 1201; DRB5
WNIN	CRX31	DRB4*0101
DKR	DRB101	DRB2*0101

#### 例 9

#### 逆ドットプロットプライミングキット

迅速かつ簡単な逆ドットプロットハイブリダイゼーションフォーマットが導入された HLA DRB タイピングキットは、対立遺伝子特異的な増幅を容易に精密なプライミングを進めるに先立ち、サンプルの単純かつ迅速なプレスクリーニングを行うために設計されたものである。このキットは、増幅試薬、陽性対照として使用される DNA、プローブが予め固定化されているナイロン片、顕色検出試薬、試験管および指示書を包含する。

プライミングは2回の増幅反応を用いて行われ、一つには DRB 一般プライマー、他方には DRB 特異的プライマーを使用した。このプライマー対は、同じ熱サイクル条件下に増幅し、したがって、2つの反応は同時に実施できる。2つのパネルのプローブは、一つは各増幅反応に特異的で、逆ドットプロットハイブリダイゼーションフォーマットに使用された。プローブのパネルはそれぞれ、取扱いを容易にするため、単一のナイロンストリップ上に固定化された。

ビオチン化プライマーを増幅反応に使用したの2、上記例 8 に記載したような比色検定を用いる以後の検出が可能となった。使用された DRB 増幅プライマーは CRX28 (SEQ ID NO: 67) および CRX29 (SEQ ID NO: 68) であった。DRB1 増幅プライマーは CRX28 および CRX37 (SEQ ID NO: 73) であった。両セットのプライマーとも上記例 8 に記載されている。

2つのプローブパネル、すなわち一方は DRB1 増幅の増幅産物とのハイブリダイゼーション用、他方は DRB1 特異的な増幅産物とのハイブリダイゼーション用は、以下に示す。各プローブのヌクレオチド配列は配列増幅部に掲げられ、各プローブの配列固定番号 (SEQ ID NO) は以下に示す。

#### DRB1 増幅のためのプローブパネル

エントリ	Seq. ID No.	AA 配列	特異性
1	DRB01	SEQ ID NO: 79	W-L-F
2	CRX104	SEQ ID NO: 90	W-L-F
3	DRB46	SEQ ID NO: 123	Y-T-S
4	DRB48	SEQ ID NO: 125	V-H
5	DRB207	SEQ ID NO: 283	G-Y-K
6	CRX102	SEQ ID NO: 89	Y-T-Q
7	DRB209	SEQ ID NO: 285	K-D-F
8	DRB20	SEQ ID NO: 98	EV
9	DRB102	SEQ ID NO: 178	E
10	DRB112	SEQ ID NO: 188	A-H
11	DRB07	SEQ ID NO: 34	F-D-B
12	DRB42	SEQ ID NO: 119	T-L-G-R-P

#### DRB1 増幅のためのプローブパネル

エントリ	Seq. ID No.	AA 配列	特異性
12	DRB233	SEQ ID NO: 299	S
13	DRB37	SEQ ID NO: 114	F-DR
14	DRB203	SEQ ID NO: 279	R
15	DRB163	SEQ ID NO: 239	K
16	DRB118	SEQ ID NO: 194	R-E/R-R-E
17	DRB01	SEQ ID NO: 61	I-DE
18	DRB38	SEQ ID NO: 113	K-GR
19	DRB222	SEQ ID NO: 298	Y
20	DRB232	SEQ ID NO: 308	I-DK
21	DRB136	SEQ ID NO: 212	F-DR
22	DRB198	SEQ ID NO: 274	V-S
C	DRB42	SEQ ID NO: 119	T-L-G-R-P

\* 配列は多数の異なる対立遺伝子上に認められる (DRB1 アミノ酸アラインメント参照)。

DRB プローブ 1~8 はほぼアミノ酸 9~13 の領域に特異的であり、プローブ 9 はアミノ酸 50 に特異的であり、プローブ 10 はアミノ酸 67~80 に特異的であり、プローブ 11 はアミノ酸 81~74 に特異的である。DRB1 プローブ 13~18, 20, および 21 はアミノ酸 87~74 に特異的であり、プローブ 12 はアミノ酸 57 に特異的であり、プロ

ープは20アミノ酸28に特異的であり、プローブ22はアミノ酸57〜60に特異的である。対照プローブはアミノ酸61〜68に特異的である。

上記パネルに示したプローブは単純化して、例7に記載の DR8タイプング方法に使用できることに留意すべきである。同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。

キットは2つの箱にパッケージされた。一つの箱には DR8試薬を、他の箱には DR81試薬を充填した。各箱にパッケージされたものは、DR8またはDR81 PCRミックス、DNAコントロール、およびタイプングストリップ；8 mM塩化マグネシウム溶液；鉱油；SA-HRP接合体；発色基（TMB）；反応槽；ならびに指示書であった。PCR は塩化マグネシウムおよび調整DNA を除くPCR に必要な試薬を含有する。記載の方法の実施に必要な他の試薬および装置はキットユーザーによって供給され、すべて一般に市販されていた。

PCR 増幅に使用するのに適したサンプル調製操作はいくつか、本技術分野において既知である。好ましい操作は、Singer-Sera: Amplification 3:11, 1989, および Walsh: BioTechniques 10(4): 605-613, 1991 に記載された（両記載とも参考として本明細書に導入する）Chelex 抽出法である。生物学的サンプルから核酸を抽出する他の技術の例には、Sambrook: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Arrand: Preparation of Nucleic Acids Probes, pp 18-30, in Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (Hames & Higgins 編, IRL Press, 1985); または PCR in Protocols, 18-20 (Innis 編, Academic Press, 1980) の記載がある。すべて参考として本明細書に導入する。

すべての DR8配列を増幅するためおよびDR81配列を特異的に増幅するためのプライマー対は、2つの別個の PCR反応に使用される。増幅反応は Saiki 号: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230-6234, 1989 の記載（参考として本明細書に導入する）にほぼ従い、以下のように実施を行う。

反応は総容積 100  $\mu$ l 中サンプル25  $\mu$ l を用いて実施する。各反応は、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g のセラデン、各 200  $\mu$ M の dATP, dCTP, dGTP および dTTP, 0.2  $\mu$ M の各ヒトゲン化増幅プライマー、ならびに *Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼ (Pfu) を含有させる。

で、旋回速度は約50rpm で5分間インキュベートし、ウエルを再び吸引する。

ストリップを含む各ウエルに、3mlの洗浄/酵素接合溶液（3.3mlの洗浄液と、使用の15分以内に蒸餾した酵素接合体27  $\mu$ l の溶液から）を加える。トレーを室温で、旋回速度は約50rpm で20分間インキュベートする。各ウエルから溶液を吸引し、ストリップを10mlの洗浄液中、室温、旋回速度は約50rpm で5分間洗浄する。最後に、洗浄液を各ウエルから吸引し、ついでストリップを発色工程に移す。

発色工程は DR8およびDR81の両者について同じである。各ウエルに10mlのグエン酸緩衝液（100mMグエン酸ナトリウム、pH 5.0）を加え、トレーを約50rpm の旋回速度機上に置く。好ましくは発色溶液はこの間に調製する（使用前10分以内）。各ウエルの発色溶液は、10mlのグエン酸緩衝液、10  $\mu$ l の3%過酸化水素、および0.5ml [TMB] 色原溶液（Pfuから市販されている）を慎重に（漏れを起こさない）混合する。トレーを旋回速度機からはずし、グエン酸緩衝液を吸引し、新たに作成した発色溶液10mlを各ウエルに加える。トレーは、発色工程の始めから、アルミホイルのカバーを用いて遮光する。ストリップは、室温、旋回速度は約50rpm で30分まで発色させる。所望のシグナル強度が得られたならば直ちに、発色工程は終結させることができる。

所望のシグナル強度が達成されたならば、トレーを旋回速度機からはずし、各ウエルの内容を吸引する。各ウエル内を10mlの脱イオン水で洗浄して発色を停止させる。水を加え、トレーを室温、約50rpm の旋回速度機上で5分間洗浄し、各ウエルの内容を徐々に逆置出す。少なくとも3回洗浄しなければならない。

ストリップは、タイプングトレー中に逆光して、2°C〜8°Cで2〜3日間保存できる。ストリップは湿潤時に永久保存用に撮影する。ストリップは、わずかに発色はするが、乾燥して暗所に保存することもできる。結果は、DNA プローブストリップ上の青色のドットのパターンを読取り解釈する。それぞれの青色ドットは、ヒトゲン化増幅生成物が固定化プローブとハイブリダイズしたことを意味する。すべての DR8対立遺伝子を検出する内部対照プローブ (DR842) は、ストリップ上の他の陽性ドットの強度と同等もしくはそれより弱い強度のドットを産生するように設計する。これは、陽性と評価すべき最低のドット強度を示す。

上記キットのプローブは、31のDR81タイプを識別する。これらのプローブで定

量増幅反応には同一の温度プロフィールを使用し、前反応を同じサーモサイクラー中で同期に行うことが可能にする。サーモサイクラーは、以下の温度プロフィール、すなわち86°Cで80秒間変性、60°Cで30秒間アニーリング、72°Cで80秒間延長の35サイクルにプログラムする。サーモサイクラーは、最後のサイクルに続いて72°Cでさらに7分間サンプルをインキュベートするようにプログラムする。

PCR からの増幅DNA は二重鎖で、オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするように変性されなければならない。増幅DNA はサーモサイクラー中95°Cで5〜10分間変性し、その温度に使用時まで保持する。別法として、変性した増幅DNA を95°Cの温度から直接氷浴に移すことができる。急速な冷却は、DNA を変性型で安定化する。増幅DNA は、ハイブリダイゼーションが行われるまで、氷浴中に保持する。

2個のナイロン膜ストリップのそれぞれに12個のプローブを付着させる。一方のストリップは DR8増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有し、他のストリップはDR81特異的増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有する。ハイブリダイゼーション反応は、それぞれのプローブ含有ストリップを別個のウエル中に保持するトレー中で行われる。ハイブリダイゼーショントレーはPfuから市販されている。通常、キットで供給される。以下に記載するハイブリダイゼーション条件は DR8ハイブリダイゼーションに特異的である。DR81 DNAハイブリダイゼーションプロトコルは DR8プロトコルとは、DR81ハイブリダイゼーションが60°Cではなく55°Cで行われる点で異なる。プロトコルの他の点はすべて同一である。

ストリップを含む各ウエルは、予め加熱したハイブリダイゼーション溶液（4  $\times$  SSPEおよび0.5%重量/容積 SDS）3 ml、ついで25  $\mu$ l の増幅DNA を加える。トレーの内容を注意深く混合した後、トレーを50°Cの恒温水浴中に入れ50°C、約80rpm で20分間インキュベートする。

ストリップは最初、室温条件下の洗浄の前に洗浄液（1.0  $\times$  SSPEおよび0.1%重量/容積 SDS）10 ml 中、室温で数秒間洗浄し、各ウエルを吸引する。室温洗浄の温度および時間にはとくに制限はない。予め加熱した洗浄液（10 ml）を各ウエルに加え、トレーを、60°Cの恒温水浴中約80rpm で12（ $\pm$ 2）分間インキュベートする。各ウエルを吸引したのち、各ウエルに10mlの洗浄液を加え、トレーを室温

維持されるタイプの一部が関連対立遺伝子のセットである。図10には、1990対立遺伝子セットのプローブハイブリダイゼーションパターンを示す。図11, 12, および13には、各プローブハイブリダイゼーションパターンの可能な判定を提示する。ストリップの結果は、図11〜13を直接用いて容易に判定できる。

結果の簡便な判定操作はまた、プローブハイブリダイゼーションパターンを入力すると、すでに入力されている既知の対立遺伝子のパターンと合致させて、可能な判定を提供するコンピュータプログラムによって行うこともできる。プローブハイブリダイゼーションパターンを可能性のある対立遺伝子の組み合わせと合致させるのに適当なアルゴリズムには、単純なテーブルルックアップおよび判定トリアルアルゴリズムが含まれる。プログラム入力の手操作によっても、また青色のハイブリダイゼーションドットの強度を検出する自動ストリップリーダーによってもよい。

上述のように、この対立遺伝子プロットタイプングによっても、可能なすべてのタイプを完全に識別はできない。たとえば、このシステムは DR2血清型の細分類はできない。ある種のヘテロ接合体の組み合わせも完全には分割できない。これらはすべて、以下の例12に説明するように、対立遺伝子特異的増幅およびプローブのための別のプライマー対によって解決できる。

プライマー対DR28 およびDR29 のハイブリダイゼーション位置のため、このプライマー対で増幅した場合、位置88に存在するアミノ酸変異は必ずつづきでない。したがって、位置88のみが異なる対立遺伝子は識別できない。位置88におけるグリシンおよびバリンのみが異なる対立遺伝子は7対が知られている。これらの対立遺伝子を以下に掲げる。

#### 位置88のみが異なる対立遺伝子対

DRB1\*1501 and DRB1\*1502  
DRB1\*0302 and DRB1\*0303  
DRB1\*0403 and DRB1\*0407  
DRB1\*0404 and DRB1\*0408  
DRB1\*1101 and DRB1\*1104  
DRB1\*1301 and DRB1\*1302  
DRB1\*0802 and DRB1\*0804

## 例10

## 一般DR81タイピング手順例

例4には、DR81対立遺伝子のタイピングの概略を記載した。ここには、別の概略を記載する。DR81対立遺伝子におけるすべての45+対立遺伝子の完全な識別を達成するためには、2段階検定が使用される。第1段階は、全サンプルの DR81一般プライマー、GMRおよびGHRによる増幅である。得られた PCR産物を固定化し、どの対立遺伝子特異的増幅を実施する必要があるかおよび第2の段階でスクリーンすべき増幅産物を決定するために、第1パネルのプロープで検定する (例4と同様に)。増幅およびハイブリダイゼーションプロトコールは例4と同様である。対立遺伝子特異性を参照したハイブリダイゼーションパターンの判定は、各プロープパネルについて行われる。

## 第1段階タイピング

プロープの第1のパネルは、表4に示したプロープパネルと、2、3のプロープが異なるだけで、類似している。以下のプロープパネルに示す対立遺伝子特異性中、対立遺伝子記号の最後の文字としてのXは、特定された番号で始まるすべての対立遺伝子が認識されることを指示する。たとえば、030Xは、0301、0302 および0303と同一である。

## HLA DR81 タイピング SSRプロープの第1のパネル

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	増幅 (SSPE, °C)
CRX33	SEQ ID NO: 69	"W-L-F"	010X	0.4X, 42
GR106	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	130X, 160X	0.2X, 42
GR156	SEQ ID NO: 86	"YSTIS"	030X, 110X, 130X, 1401, 1402	0.2X, 42
GR159	SEQ ID NO: 87	"V-L-F"	040X	0.2X, 42, 20
CRX49	SEQ ID NO: 74	"G-YK"	070X	1.0X, 42
GR102	SEQ ID NO: 89	"YSTG"	080X, 120X, 1404	0.1X, 42
GR111	SEQ ID NO: 92	"K-D-F"	0901	0.4X, 42
CRX14	SEQ ID NO: 70	"EV"	1001	0.4X, 42
GR127	SEQ ID NO: 93	"E"	110X	0.2X, 42
CRX61	SEQ ID NO: 80	"S"	0403, 0409, 0410, 0411, 0801, 0803, 1304, 1305	0.1X, 42
CRX13	SEQ ID NO: 66	"A-H"	1401, 1404	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	"T-DP"	0103, 0402, 1102, 1301, 1302, 1304	0.1X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	"T-DR"	1601, 1101, 1104, 1303, 0801, 0802, 0804, 1202	0.2X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	"T-DH"	1103	0.2X, 42
CRX62	SEQ ID NO: 81	"T-DK"	1303	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

プロープをハイブリダイズし、ついで、42°Cで20分間洗浄するGR88を除き、42°Cで15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。第1のプロープパネルから得られたハイブリダイゼーションパターンに基づいて、サブタイピングこうていには対立遺伝子特異的増幅が必要になる。

DR7, DR9, およびDR10の各タイプは同定できる唯一の対立遺伝子がなく、第1段階のプロープパネルから直接同定できる。実際、DR7 タイプを特定する対立遺伝子には、DRB1\*0701 およびDRB1\*0702 がある。しかしながら、これらの2つの対立遺伝子は第3のエクソンのみで異なり、第2のエクソンからの配列を増幅および検出する本方法では識別できない。したがって、本発明の方法では唯一の明確な対立遺伝子が同定できる。

## 第2段階タイピング

## DR2

すべてのタイプが血清学的に DR2である、W-P-R (GR104) に対する陽性シグナルを含有するサンプルは、W-P-Rのエピトープを有する対立遺伝子に特異的なプライマー対、AB83およびAB80で増幅される。得られた生成物は以下のパネルで検定される。

## HLA DR2 タイピング SSRプロープ

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	増幅 (SSPE, °C)
DR83	SEQ ID NO: 140	"A"	130X	0.1X, 42
DR813	SEQ ID NO: 189	"DR"	1602	0.1X, 42 or 0.4X, 50
CRX33	SEQ ID NO: 71	"P-DK"	1601	0.2X, 42
CRX57	SEQ ID NO: 78	"V"	1501, 1502	0.2X, 42
CRX56	SEQ ID NO: 77	"U"	1102, 160X	0.2X, 42
DR8196	SEQ ID NO: 272	"H (D)"	1503	1.0X, 42
DR8197	SEQ ID NO: 273	"T (D)"	1501, 1502, 160X	1.0X, 42
GR104	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	DR2	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

示されたプロープは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。

## DR3, DR5, DR6

プロープGR159のエピトープYSTISに対する陽性シグナルを含有するサンプルは、DR3, DR5, またはDR6のいずれかである。これらの対立遺伝子は、AB82およびAB80で特異的に増幅される。これらの対立遺伝子は、以下のプロープパネルを用いて識別できる。

## HLA DR3, 5, 6タイピング SSRプロープ

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	増幅 (SSPE, °C)
CRX59	SEQ ID NO: 75	KDR	030X	0.2X, 50
GR125	SEQ ID NO: 94	Y	0301	0.2X, 50
DR8180	SEQ ID NO: 256	A	030X, 1301, 1302, 1301, 1402, 1403, 1404	0.2X, 42
GR122	SEQ ID NO: 93	E	110X	0.2X, 42
CRX61	SEQ ID NO: 80	S	1303, 1304	0.2X, 42
CRX23	SEQ ID NO: 64	A-H	1401	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	T-DP	1102, 1301-02	0.2X, 42
CRX62	SEQ ID NO: 81	T-DK	1303	0.2X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	T-DH	1103	0.2X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	T-DR	1101, 1104, 1303	0.2X, 42
CRX04	SEQ ID NO: 60	K	1402	0.1X, 42
CRX37	SEQ ID NO: 79	V	0301, 0303, 1102, 1104, 1301, 1304, 1303, 1403	0.2X, 42
CRX56	SEQ ID NO: 77	U	0302, 1101, 1302, 1303, 1305, 1402, 1403	0.2X, 42
GR156	SEQ ID NO: 86	YSTIS	DR3, DR5, DR6	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

示されたプロープは、ハイブリダイズし、ついで42°Cで15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。

## DR4

プロープGR158でVNエピトープに対する陽性シグナルを含有するサンプルは、DR4である。これらの対立遺伝子は、AB64およびAB80で特異的に増幅される。これらの対立遺伝子は、以下のプロープパネルを用いて識別できる。

特表平6-505625 (10)

プローブ	エピトープ	対立遺伝子	濃度
CRX61	S	0405, 0409, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX64	K	0401, 0409	2X, 40
CRX04	R	0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX15	R-E	0403, 0405, 0407, 0411	0.4X, 55
CRX08	DE	0402	
CRX37	V	0402, 0403, 0404, 0405, 0410, 0411	0.2X, 42
CRX56	D	0401, 0405, 0407, 0408, 0409	0.2X, 42
OH59	V-H	DR4	0.2X, 42
CRX12	DRB" 全 "	全	0.2X, 42

供されたプローブは、ハイブリダイスし、ついで42℃で15分間洗浄する。ただし、GH69の場合は例外で、42℃で20分間洗浄する。SSPE洗浄液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

#### 例1, DRx8, および DR12

プローブCRX33 でRLF エピトープに対する陽性シグナルまたはプローブDR1102 でYST6エピトープに対する陽性シグナルを含有するサンプルは DRB1 特異的プライマー-DRx8およびCRX37 で増幅される。これは、DR2, DR7, およびDR9 を除きすべてのDRB1対立遺伝子も増幅する。対立遺伝子は、ついで、以下に示すプローブパネルを用いて識別できる。

プローブ	エピトープ	対立遺伝子	濃度 (SSPE, °C)
CRX33	WLF	010X	0.4X, 42
CRX04	R	0101, 0102, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX06	DE	0103, 1101, 1301, 1302	0.2X, 42
CRX37	V	0301, 0402, 0403, 0404, 0405, 0410, 0411, 1102, 1103, 1104, 1301, 1304, 1401, 1404, 1405, 0804	0.2X, 42
DRB181	AV	0102, 1201, 1202	0.1X, 42
CRX35	G	0101, 0103, 0303, 0401, 0405, 0407, 0408, 0409, 1101, 1302, 1303, 0801, 0802, 0803, 1305, 1402, 1403	0.2X, 42
GH102	YST6	0801, 0802, 0803, 0804, 1201, 1202, 1404	0.1X, 42
GH54	V-S	1201, 1202	0.4X, 42
CRX63	F-DR	1201, 0303	0.2X, 42
CRX35	F-DR	0801, 0802, 1202, 1101, 1104, 1305	0.2X, 42
CRX12	DRB" 全 "	全	0.2X, 42

示されたプローブは、ハイブリダイスし、ついで42℃で15分間洗浄する。SSPE洗浄液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

プローブによって認識されるエピトープの一部は多くの対立遺伝子によって共有されるので (たとえばDR9, 上記プローブパネルとのハイブリダイゼーションパターンから得られる結果は、プローブがDR1, DRx8, もしくはDR12 に関連するか、またはDRB1特異的プライマーで同様に増幅される他の対立遺伝子が関連するかを決定するために、ほかの対立遺伝子特異的増幅と比較される。RLF およびYST6エピトープはタイピングの結果の判定を単純化する。

#### 例11

##### ヘテロ接合体の対立遺伝子サブタイピング

例10のプローブパネルとのハイブリダイゼーションパターン単独では、ある種のヘテロ接合体に存在する対立遺伝子の明確な決定には不十分である。プロ

ブハイブリダイゼーションパターンは、サンプル中にどの対立遺伝子エピトープが存在するかを示す。存在する特異的対立遺伝子を決定するには、このエピトープがどの対立遺伝子に存在するかを知る必要がある。通常、エピトープ起源は、対立遺伝子の組み合わせの可能性に限定があるので、推測可能で、このような不明瞭はほとんど起こらない。起こることがある場合には対立遺伝子特異的増幅を用いて解決される。

DR5/DR8ヘテロ接合体では、以下のプローブパターンが起り得る。

プローブ	GH54	GH122	DRB181	CRX04	CRX31	CAN51	CRX37
エピトープ	YST6	S	DA	S-DE	F-DR	G	V

3つの異なるDR5/DR8ヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせが、このプローブハイブリダイゼーションパターンを生じる。これらの組み合わせを以下に掲げる。これらのヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせは他のプローブでは識別できない。

DRB1*1101	および	DRB1*1301
DRB1*1104	および	DRB1*1302
DRB1*1102	および	DRB1*1305

これらの可能性を識別するためには、位置88における独特の二形性を利用する他のプライマーが設計された。DRB1対立遺伝子はすべて、位置88にバリンまたはグリシンを含有する。上に掲げた各ヘテロ接合体では、一方の対立遺伝子は位置88にバリンを、他方はグリシンを含有する。DRB1\*1301, DRB1\*1104, および DRB1\*1102はそれぞれ位置88にバリンを、DRB1\*1101, DRB1\*1302, および DRB1\*1305はそれぞれグリシンを含有する。VまたはG特異的プライマーを群特異的プライマー (N-PR, VH, またはYST6) と組み合わせる用いた増幅では、位置88における多形に基いた単一对立遺伝子の増幅が可能になる。この方法で、各ヘテロ接合体に存在する2つの対立遺伝子の一方を選択的に増幅することが可能で、直接プローブハイブリダイゼーションによって決定できる。第二の対立遺伝子は、可能な対立遺伝子の組み合わせに基づく第一の対立遺伝子の知識から推定できる。

単一对立遺伝子増幅によるDR5/DR8ヘテロ接合体のサブタイピングは、PCRプライマー-DRB2/RAP55およびDRB2/RAP58を用いて達成された。増幅は、PCR 緩衝液に最終濃度1.0mM MgCl<sub>2</sub> を添加したほかは例10と同様に実施した。サーモサイクラーは35サイクルにプログラムした。温度プロフィールは、94℃にランズ、94

℃で30秒間変性、30秒間アニーリング、および70℃で延長とした。プローブハイブリダイゼーションは前述の通り行った。V-特異的 (RAP58) およびG-特異的 (RAP55) プライマーは以下に、また配列掲載部に示す。それぞれDRB2と組み合わせる使用したが、他の群特異的プライマーも適当である。

プライマー	SEQ ID NO:	性質	配列
RAF55	SEQ ID NO: 312	G (86)	5'-CGCTGCACTGTGTAAGCTCTTCACCA
RAF58	SEQ ID NO: 313	V (86)	5'-CGCTGCACTGTGTAAGCTCTTCACCA

#### 例12

##### DRB2段階タイピングキット

ここに記載されるキットは、可能な限り多数のタイプを効率的に同定するために設計されたものである。プライマーおよびプローブは、逆トットプロットフォーマットにおいて、DRB1およびDRB3遺伝子座の迅速な、しかしながら完全なタイピングを提供するために設計される。DRB1遺伝子座における全46対立遺伝子およびDRB3遺伝子座の3個の対立遺伝子の完全な識別を達成するために、2段階検定を使用する。第一段階は、全サンプルの DRB1-群プライマー、DRB27 (SEQ ID NO: 105) およびDRB28 (SEQ ID NO: 108) による増幅である。得られた PCR産物をT3プローブのストリップに対してスクリーニングし、これで対立遺伝子特異的増幅、および第二段階のスクリーニングが必要か否かが決定される。

増幅およびハイブリダイゼーションは例9と同様に行う。DRB1-群の増幅産物は、DRB1遺伝子座の第一可変領域に特異的な8つのプローブ、3つのDRB3遺伝子座 (82a, 82b, 82c) に特異的な4つのプローブ、および1つのコントロールプローブを含有するプローブパネルに対してスクリーニングする。3つの対立遺伝子を得る。DR2ハロタイプに見出されるDRB5遺伝子座をタイピングするため、このストリップにさらにもう1つのプローブを付加することもできる。認識される特異的ハイブリダイゼーション領域およびタイプを以下に掲げる。

増殖されるタイプ	増殖配列
1 DR1	WLF
2 DR2	WPR
3 DR3, 5, 6	YSTS
4 DR4	VH
5 DR7	OYK
6 DR8, 12	YSTG
7 DR9	KDF
8 DR10	SV
9 52a	LRS
10 52b, 52c	LLS
11 52b	設計中
12 52c	設計中
13 52	TELGRR

DR8タイプはこの検定の結果から決定され、この検定の結果に基づいて、どちらの対立遺伝子特異的増殖(ASA)を行う必要があるかを決定する。サンプルのタイピングに最も必要なものは2つであるが、5つの異なるASAを提示する。同じ3'プライマー、AB60はたとえば、すべての5つのASAに代えて使用でき、通常、キット中に加えられる成分に包含される。5'プライマーによって、増殖特性が付与される。各5'プライマーによって増殖される DR8タイプおよび保蔵されるエビトープを以下に掲げる。プライマー2、3および4が設計され、広範囲に試験され、上記実施例で説明した。

増殖されるタイプ	ハイブリダイゼーション配列
DR1	WLF
DR2	WPR
DR3, 5, 6	YSTS
DR4	VH
DR8, 12	YSTG

第二段階は、ASAからの増殖産物の5つのタイピングを可能にする一連のプロープに歸する。一実施形態においては、すべてのプロープを単一のストリップに付着させ、この単一のストリップを ASAからの生成物のタイピングに使用する。以下の領域に特異的なプロープが ASAの結果のタイピングに十分である。

領域	エビトープ
57-60	DAE, S, E, A-H, V-S
67-74	R, I-DE, I-A, F-DR, DR, KUZ, K, R-B/RR-E, F-DR, I-DK, I-DR, DR-L
85-86	G, V, AV
その他	U (a.a. 20), H (a.a. 30), Y (a.a. 26), S (a.a. 37)

「その他」の領域の多形は白人の間では極めて稀である。しかしながら、本発明の重要な目的は非白人集団のタイピングも可能にすることである。これらの位置における他のプロープを、ヘテロ接合体対ホモ接合体の識別における不明瞭性の解決のために、包含させることもできる。

## 表9

## 1989対立遺伝子セットに含まれない対立遺伝子

DRB1\*0303 (SEQ ID NO: 61): \*\* TAA \*\*\* AAG TAT TGT AGG GGT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
CAT AAC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG

DRB1\*0403 (SEQ ID NO: 13): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAG GAG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT CAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*0410 (SEQ ID NO: 15): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAG GAG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT CAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*0413 (SEQ ID NO: 17): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAG GAG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT CAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*0804 (SEQ ID NO: 23): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT AAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1108 (SEQ ID NO: 39): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT AAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1109 (SEQ ID NO: 41): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT AAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1304 (SEQ ID NO: 55): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT AAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1403 (SEQ ID NO: 59): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAG GAG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT CAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1403 (SEQ ID NO: 61): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT CAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

DRB1\*1501 (SEQ ID NO: 44): CA GGT TTC TTC GAG CAG GGT AAA CAT GAG  
TGT CAT TTC TTC AAT GCG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
TAT AAG CAA GAG GAG TCA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG  
GCG GCG AGT GAG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
GAG GCG GCG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
TAC GCG GGT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCG GAG

FIG. 1

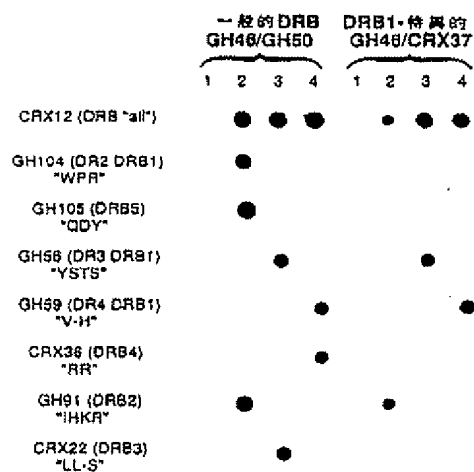


FIG. 2

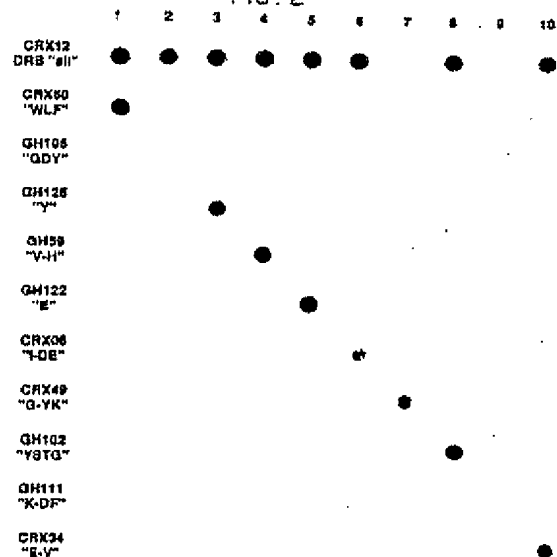


FIG. 3

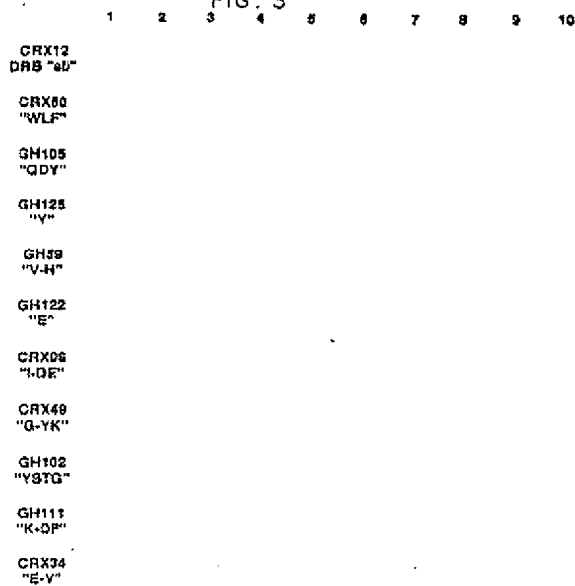
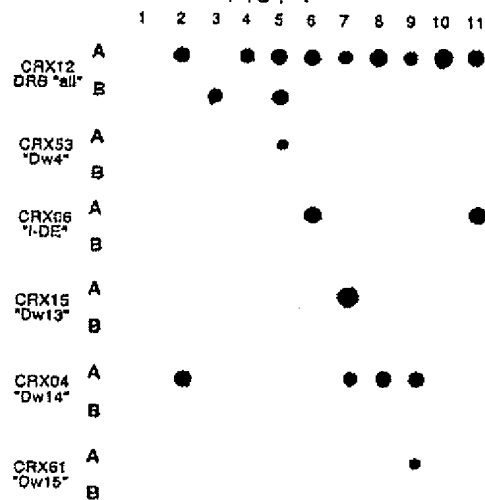


FIG. 4





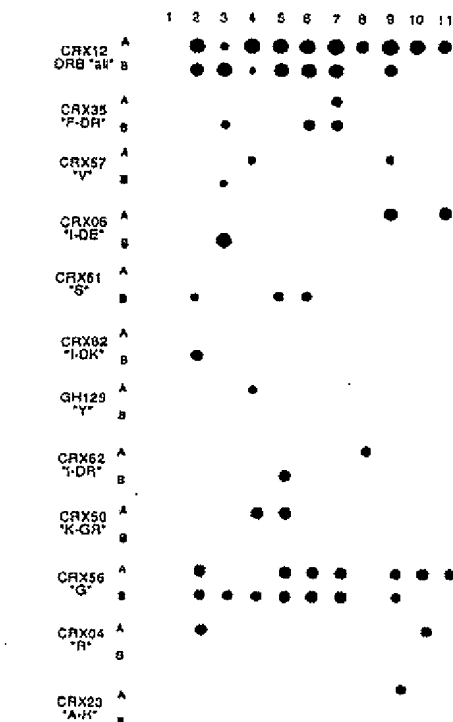


FIG. 5

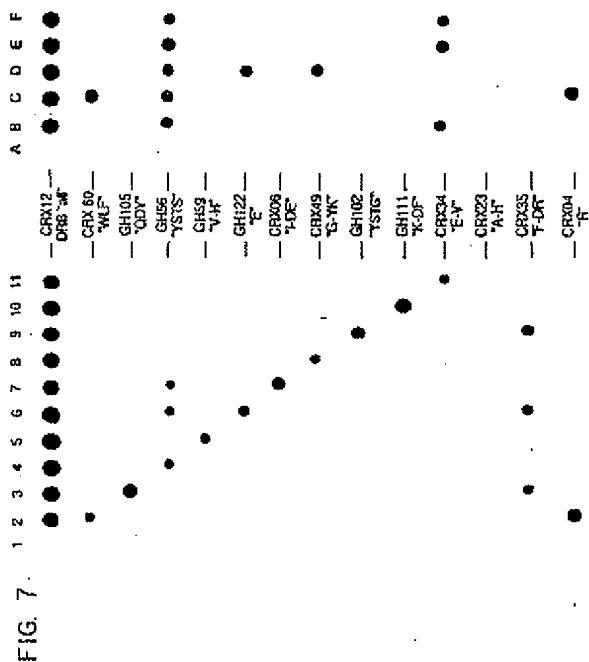


FIG. 7

Gene	CRX12	CRX35	CRX57	CRX06	CRX61	CRX82	GH129	CRX62	CRX50	CRX56	CRX04	CRX23
CRX12												
CRX35												
CRX57												
CRX06												
CRX61												
CRX82												
GH129												
CRX62												
CRX50												
CRX56												
CRX04												
CRX23												

FIG. 6

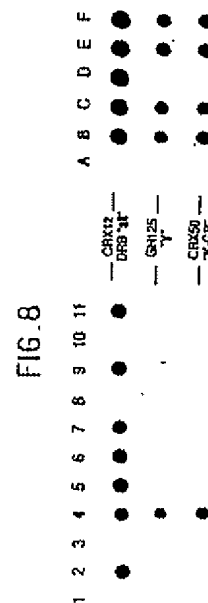


FIG. 8



[illegible]

DRB 95769-7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23  
 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039

## ACT/US 91/09296

1. CLASSIFICATION OF LITURGY MATTER: Is source document (includes any, without US?) Answer: ( ) International; ( ) United States; ( ) U.S. and Foreign; ( ) Other, specify:	
2. ANALYSIS SEARCHED:	
Classification Symbol:	Documentary Description Symbol:
[Int. Cl. 5]	C12Q
Document(s) Searched under Same Member Designation? or the Same but with Document(s) Reported in the Entry Searched?	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:	
Category:	Character of Document: ( ) Abstract; ( ) Bibliography; ( ) Review; ( ) Other, specify:
X	WO, A, 8 911 547 (CETUS CORP) 30 November 1989 see claim 1
X	IMMUNOGENETICS vol. 30, September 1989, NEW YORK US pages 208 - 211 L. RUGGER ET AL.: Typing for HLA-DPB1*03 and HLA-DPB1*06 using allele-specific DNA in vitro amplification and allele-specific oligonucleotide probes. Detection of "new" DPB1*06 variants. see the whole document
A	WO, A, 8 904 875 (CETUS CORP) 1 June 1989 see page 44, line 14 - line 19
	3, 6, 7, 10, 11, 12, 24, 28, 29
	-/-
* Special language of filed document(s): ( ) *1 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *2 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *3 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *4 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *5 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *6 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *7 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( ) *8 "A" document(s) published in a language other than that in which the document is to be published: ( )	
IV. CERTIFICATION:	
One of the Above: ( )	One of the Above: ( )
87 APRIL 1988	21.04.92
International Searching Authority:	International Searching Authority:
EUROPEAN PATENT OFFICE	EUROPEAN PATENT OFFICE

### Intercompany Applications for

PCT/US 91/09204

ALL DOCUMENTS CONTAINED HEREIN TO BE RELEASED		CONTINUED FROM EYES JOINTLY SHEET	
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to Other File	
A	<p>EP, A, O 237 862 (CETUS CORP) 16 September 1987  cited in the application</p> <p>see page 43, line 2 - line 6</p>	<p>5, 7, 10,  12, 13,  15, 16,  18, 19,  26-29</p>	

## 国際調査報告

US 9109284  
SA 85499

This issue lists the patent family members included in the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as recorded in the European Patent Office EDP file. The European Patent Office is not responsible for these particulars which are merely given for the purpose of information. 07/04/92

Patent document cited in international report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8911587	50-11-89	AU-A- 3690889	18-12-89
		EP-A- 0437160	23-03-91
		JP-A- 3504326	26-03-91
WO-A-8901875	01-06-89	EP-A- 0438458	07-08-91
EP-A-0237362	16-09-87	AU-B- 594133	01-03-90
		AU-A- 5988287	17-09-87
		EP-A- 0159512	04-12-91
		EP-A- 0459833	04-12-91
		JP-A- 62214355	21-09-87

For more details about this issue, see Official Journal of the European Patent Office, No. 15/92

## フロントページの続き

- (72)発明者 ブガワン, テオドリカ  
アメリカ合衆国94579 カリフォルニア州  
サン リードンロ, ファリス ストリート  
15524
- (72)発明者 グリフィス, ロバート エル.  
アメリカ合衆国94002 カリフォルニア州  
ベルモント, オーク クノール ドライブ  
1820

- (72)発明者 シャーフ, スチーブン ジェイ.  
アメリカ合衆国94709 カリフォルニア州  
パークレー, フランシスコ ストリート  
2028-1 / 2
- (72)発明者 アップル, レイモンド ジェイ.  
アメリカ合衆国94116 カリフォルニア州  
サン フランシスコ, トウェンティーセカ  
ンド アベニュー 2622





[illegible]

12. 第二のハミナリのプロワップは、RRR01 (SE011) NO:789、C:194 (SE9、J NO:40)、  
BBAR4 (SE011) NO:1234、BB446 (SE011、C NO:1789)、BBR997 (SE011) NO:5678、C:02 (SE011  
C NO:569)、BBR209 (SE011) NO:289、BBR20 (SE011) NO:569、C:02 (SE011) NO:1789、  
BBR12 (SE011) NO:189、BBR07 (SE011) NO:341、およびBBR47 (SE011) NO:10、  
1789) がらなる若より選にける2種またはそれ以上のプロワップからなる「請求項1」  
記載の装置。

23. 第二のミサイルのブローブは、010223Z(56)ID NO: 2280, DR337(56)ID NO: 1434, DR328(56)ID NO: 2757, DR316(56)ID NO: 2389, DR318(56)ID NO: 307, 347, 0350Z(56)ID NO: 311, 0353Z(56)ID NO: 1151, DR309(56)ID NO: 2681, DR3292(56)ID NO: 3008, DR3135(56)ID NO: 2127, 0509:09Z(56)ID NO: 2147, およびDR347(56)ID NO: 1010: かななる程よく選ばれるか懸念は持たれ、以上のブローブがなされる「誘惑ミサ」の総数のみ。

[illegible]

1A HQ:144), DR8208(SEQ ID NO:779), DR8163(SEQ ID NO:729), DR8115(SEQ ID NO:704), DR902 (SEQ ID NO:61), DR838(SEQ ID NO:116), DR8222(SEQ ID NO:239), DR 8232(SEQ ID NO:905), DR8138(SEQ ID NO:212), DR8166(SEQ ID NO:274), およびDR 042 (SEQ ID NO:115) からなる「請求項2」記載の方法

28. サンプルの対立遺伝子 0101, 0102, 0103, 1501, 1602, 1603, 1604, 1501, 1602, 0301, 0302, 0303, 0471, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0438, 0409, 04010, 04011, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1201, 1202, 1203, 1204, 1301, 1302, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583, 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606, 1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628, 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634, 1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673, 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1679, 1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688, 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694, 1695, 1696, 1697, 1698, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718, 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733, 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748, 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754, 1755, 1756, 1757, 1758, 1759, 1760, 1761, 1762, 1763, 1764, 1765, 1766, 1767, 1768, 1769, 1770, 1771, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776, 1777, 1778, 1779, 1780, 1781, 1782, 1783, 1784, 1785, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793, 1794, 1795, 1796, 1797, 1798, 1799, 1800, 1801, 1802, 1803, 1804, 1805, 1806, 1807, 1808, 1809, 1810, 1811, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 1821, 1822, 1823, 1824, 1825, 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832, 1833, 1834, 1835, 1836, 1837, 1838, 1839, 1840, 1841, 1842, 1843, 1844, 1845, 1846, 1847, 1848, 1849, 1850, 1851, 1852, 1853, 1854, 1855, 1856, 1857, 1858, 1859, 1860, 1861, 1862, 1863, 1864, 1865, 1866, 1867, 1868, 1869, 1870, 1871, 1872, 1873, 1874, 1875, 1876, 1877, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, 1883, 1884, 1885, 1886, 1887, 1888, 1889, 1890, 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896, 1897, 1898, 1899, 1900, 1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1915, 1916, 1917, 1918, 1919, 1920, 1921, 1922, 1923, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928, 1929, 1930, 1931, 1932, 1933, 1934, 1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943, 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2

(e) サンプル中の31P核磁を増幅し、ついて

(6) 工段(c)で準備された上記試験をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を越える正置に相補性の配列にのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

29. 第一のパネルは、オリゴヌクレオチドプローブは、5'-GGTGGG(SO<sub>3</sub>)-3' (10:100).

73C4C5E0 0 80:80, GH56C5C0 1D 80:00, GH60C5E0 1D 80:87, C8748C50 1D  
80:70, GH102C5E0 3 80:09, GH111C5E0 1D 80:92, CR34C5E0 1D 80:70, GH122  
C5E0 1D 80:3C, CR63C5E0 1D 80:80, CRX22C5E0 1D 80:26, CRX05C5E0 1C 80:  
67, CR25C5E0 1D 80:71, CRX03C5E0 1C 80:84, C8A62C5E0 1D 80:71) から選  
び、それぞれを2要素またはそれ以上のプロ プラムからなる「請求項1」に記載の方法

27. 第二のブロープのパネルは第二のブロープのパネルから測られる2枚またはそれ以上のブロープからなり、第三のパネルはパネルSH104 (550 10, NC-90)。

[illegible]

CRX56 (SEO 10 NO:61), CRX57 (SEO 10 NO:78), CRX58 (SEO 10 NO:79), GH59 (SEO 10 NO:87), GH59/CRX33 (SEO 10 NO:68), CRX04 (SEO 10 NO:30), CRX08 (SEO 10 NO:61), CRX57 (SEO 10 NO:78), CRX81 (SEO 10 NO:257), CRX98 (SEO 10 NO:77), GR302 (SEO 10 NO:89), GH54 (SEO 10 NO:68), CRX01 (SEO 10 NO:32), CRX02 (SEO 10 NO:71) の各品番より選ばれる「格別表 1」に記述の方法

28. 下程 (2) において用いられるプライマーは 0H40 (SEQ ID NO: 67) および 0H50 (SEQ ID NO: 68) であり、工程 (3) において用いられるプライマーは A483 (SEQ ID NO: 69) と A850 (SEQ ID NO: 57)、A875 (SEQ ID NO: 58)、A803、A654 (SEQ ID NO: 56) と A850、および 0H40 (SEQ ID NO: 57) と 0H57 (SEQ ID NO: 73) からなるより好ましい、オプティムシグナレッドプロトコルの場合のノナルは、プルーブ 0R23 (SEQ ID NO: 59)、0H124 (SEQ ID NO: 60)、0H56 (SEQ ID NO: 61)、0H67 (SEQ ID NO: 67)、0R49 (SEQ ID NO: 74)、0H702 (SEQ ID NO: 69)、0H11 (SEQ ID NO: 62)、0R334 (SEQ ID NO: 70)、0H172 (SEQ ID NO: 63)、0R481 (SEQ ID NO: 80)、0R45 (SEQ ID NO: 66)、0R308 (SEQ ID NO: 64)、0R55 (SEQ ID NO: 71)、0R53 (SEQ ID NO: 65)、および 0H50 (SEQ ID NO: 68) からなるより好ましい 2 種またはそれ以上のプルーブからなり、第 2 のノナル プライマーは異なるプルーブのノナルから選ばれたとされたより好ましいプルーブからなり、第 3 のプライマーは (A154+194 (SEQ ID NO: 59)、0R635 (SEQ ID NO: 149)、0H913 (SEQ ID NO: 68)、0R13 (SEQ ID NO: 71)、0R57 (SEQ ID NO: 76)、0R55 (SEQ ID NO: 77)、0R196 (SEQ ID NO: 72)、0R197 (SEQ ID NO: 74)、0H215 (SEQ ID NO: 61)、および 0R242 (SEQ ID NO: 79)、0R57 (SEQ ID NO: 75)、0H123 (SEQ ID NO: 60)、0R1 (SEQ ID NO: 260)、0H122 (SEQ ID NO: 62)、0R561 (SEQ ID NO: 80)、0R23 (SEQ ID NO: 59)、0R495 (SEQ ID NO: 61)、0R22 (SEQ ID NO: 81)、0R465 (SEQ ID NO: 64)、0R435 (SEQ ID NO: 73)、0R244 (SEQ ID NO: 80)、0R57 (SEQ ID NO: 74)、0R46 (SEQ ID NO: 77)、0H136 (SEQ ID NO: 63)、0R57 (SEQ ID NO: 90)、0R57 (SEQ ID NO: 83)、0R404 (SEQ ID NO: 60)、0R15 (SEQ ID NO: 64)、0R400 (SEQ ID NO: 67)、0R57 (SEQ ID NO: 76)、0R56 (SEQ ID NO: 77)、0R50 (SEQ ID NO: 87)、および 0R433 (SEQ ID NO: 68)、0R435 (SEQ ID NO: 74)、0R46 (SEQ ID NO: 61)、0R57 (SEQ ID NO: 76)、0R491 (SEQ ID NO: 60)、0R50 (SEQ ID NO: 72)、0H102 (SEQ ID NO: 65)、0H4 (SEQ ID NO: 85) 0R495 (SEQ ID NO: 82)、0R435 (SEQ ID NO: 71) からなるより好ましい 1 種または 2 種またはそれ以上のプライマーからなる。

29. 工程 (e) において用いられるプライマーは、CH40 (SEQ ID NO: 67) および CH50 (SEQ ID NO: 68) であり、上層 (c) に於いて用いられるプライマーは、A483 (SEQ ID NO: 69) と A406 (SEQ ID NO: 57)、A282 (SEQ ID NO: 58) と A465、A354 (SEQ ID NO: 60) と A480、および G448 (SEQ ID NO: 67) と G537 (SEQ ID NO: 73) からなる群より選ばれる。オリゴヌクレオチドプローブの第一のバーナールプローブ CR33 (SEQ ID NO: 60)、GH1C (SEQ ID NO: 69)、S466 (SEQ ID NO: 63)、GH58 (SEQ ID NO: 67)、CR440 (SEQ ID NO: 74)、GH102 (SEQ ID NO: 69)、GH11 (SEQ ID NO: 82)、CX354 (SEQ ID NO: 70)、GH122 (SEQ ID NO: 63)、CRX61 (SEQ ID NO: 59)、CRX23 (SEQ ID NO: 64)、CRX06 (SEQ ID NO: 61)、CRX59 (SEQ ID NO: 71)、CRX63 (SEQ ID NO: 64)、および CRX62 (SEQ ID NO: 61) からなり、第二のバーナールプローブ GH104 (SEQ ID NO: 83)、CRX63 (SEQ ID NO: 143)、CR3113 (SEQ ID NO: 169)、CRX35 (SEQ ID NO: 71)、CRX57 (SEQ ID NO: 78)、CRX62 (SEQ ID NO: 77)、CRX06 (SEQ ID NO: 272)、CRX157 (SEQ ID NO: 273)、CRX216 (SEQ ID NO: 231)、および CRX218 (SEQ ID NO: 231)、CRX40 (SEQ ID NO: 75)、CRX62 (SEQ ID NO: 60)、CRX63 (SEQ ID NO: 266)、GH122 (SEQ ID NO: 63)、CRX67 (SEQ ID NO: 67)、CRX23 (SEQ ID NO: 64)、CRX06 (SEQ ID NO: 61)、CRX62 (SEQ ID NO: 81)、CRX63 (SEQ ID NO: 84)、CRX59 (SEQ ID NO: 71)、CRX04 (SEQ ID NO: 59)、CRX63 (SEQ ID NO: 78)、CRX66 (SEQ ID NO: 77)、および GH50 (SEQ ID NO: 58)、CRX701 (SEQ ID NO: 80)、CRX64 (SEQ ID NO: 83)、CRX04 (SEQ ID NO: 69)、CRX15 (SEQ ID NO: 84)、CRX06 (SEQ ID NO: 67)、CRX57 (SEQ ID NO: 78)、CRX59 (SEQ ID NO: 77)、CRX59 (SEQ ID NO: 87)、および CRX23 (SEQ ID NO: 89)、CRX04 (SEQ ID NO: 63)、CRX62 (SEQ ID NO: 63)、CRX63 (SEQ ID NO: 78)、CRX11 (SEQ ID NO: 257)、CRX66 (SEQ ID NO: 77)、GH102 (SEQ ID NO: 69)、GH5C (SEQ ID NO: 85)、CRX64 (SEQ ID NO: 82)、CRX36 (SEQ ID NO: 71) からなる群より選ばれる (請求項 2) に記載の方法。

32. RA05(5E 10 20:3'2), および RA03(5E 10 10:3'3)からなる群より選ばれるグループ